Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Freien Universität Berlin
1 Berlin 33, Arnimallee 22
Direktor: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. E. Schütte

WIRKUNG DER THIAZOLIDINE AUS L-GLYCERINALDEHYD UND L-CYSTEIN BZW. D-PENICILLAMIN AUF AEROBE UND ANAEROBE GLYKOLYSE UND ATMUNG VON ASCITESTUMORZELLEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1970

vorgelegt von
Dagmar Modersohn
aus Danzig

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Freien Universität Berlin
1 Berlin 33, Arnimallee 22
Direktor: Prof.Dr.med.Dr.rer.nat.E.Schütte

Wirkung der Thiazolidine aus L-Glycerinaldehyd und L-Cystein bzw. D-Penicillamin auf aerobe und anaerobe Glykolyse und Atmung von Ascitestumorzellen

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dagmar Modersohn
aus Danzig

Dekan:	Professor Dr. med. Herbert L a x
Referent:	Professor Dr. rer. nat. Peter S i e g m u n d
Korreferent:	Professor Dr. med. Hans H e r k e n

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 17. März 1970

Gliederung

		Seite
I.	Einleitung	3 - 8a
	1. Einführung	3
	2. Aufgabenstellung	6
II.	Ergebnisse und Diskussion	8b - 42
	1. Messung der Geschwindigkeit der Reaktion von L-Glycerinaldehyd mit L-Cystein bzw. D-Penicillamin im lichtelektrischen Polarimeter	8b
	2. Verfolgen der Reaktion durch Titration der dabei entstehenden Wasserstoff-Ionen	14
	3. Präparative Herstellung der Thiazolidine	18
	4. Charakterisierung der hergestellten Thiazolidine	19
	5. Wirkung der Thiazolidine auf die aerobe Glykolyse von Ascitestumorzellen	25
	6. Wirkung der Thiazolidine auf die anaerobe Glykolyse von Ascitestumorzellen	31
	7. Wirkung des Thiazolidins II auf die Atmung von Ascitestumorzellen	37
III.	Beschreibung der Versuche	43 - 67
	1. Apparate	43
	2. Chemikalien	43
	3. Herstellung des L-Glycerinaldehyds und Kontrollen	44

Seite

4. Messung der Reaktionsgeschwindigkeit im lichtelektrischen Polarimeter 50

5. Verfolgen der Reaktion durch acidimetrische Titration der entstehenden Wasserstoff-Ionen

6. Präparative Herstellung der Thiazolidine aus L-Glycerinaldehyd mit L-Cystein bzw. D-Penicillamin 52

7. Charakterisierung der Thiazolidine 54

8. Isolierung von Ascitestumorzellen 58

9. Inaktivierung von Ascitesserum 58

10. Bestimmung und Einstellung der Alkalireserve (Standard-Bicarbonat) in inaktiviertem Mäuseascitesserum 58

11. Herstellung der Zellsuspensionen 59

12. Bestimmung der Cytokrit-Werte 59

13. Messung der aeroben Glykolyse 60

14. Messung der anaeroben Glykolyse 65

15. Messung der Atmung mit einer Eingefäßmethode bei physiologischem CO_2-Partialdruck nach O. Warburg 66

IV. Zusammenfassung 68 - 69

V. Literaturverzeichnis 70 - 76

VI. Lebenslauf 77

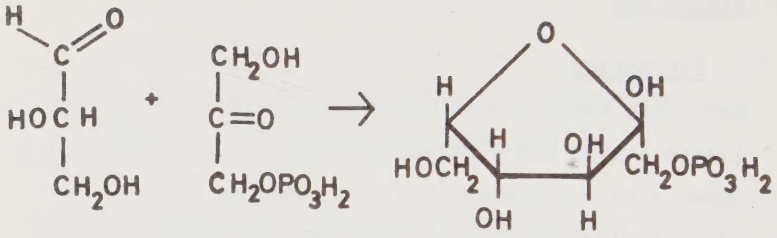
I. Einleitung

1. Einführung

Nach Otto Warburg sind Tumorzellen durch eine relativ kleine Atmung und eine große Glykolyse gekennzeichnet. Daher sind Substanzen, die eine hemmende Wirkung auf die Glykolyse ausüben, die Atmung jedoch unbeeinflußt lassen, hinsichtlich einer möglichen cancerostatischen Wirkung stets interessant.

1929 hatte B.Mendel (22) bei Versuchen mit Schnitten von Jensensarkomen der Ratte gefunden, daß L-Glycerinaldehyd die Glykolyse hemmt, während D-Glycerinaldehyd wirkungslos war. Die Arbeiten von O.Meyerhof u.a. (24) G.Embden u.a. (9) und H.A.Lardy u.a. (16) geben eine Erklärung für diesen Befund. Aldolase katalysiert nämlich nicht nur die reversible Kondensation von Dihydroxyacetonphosphat und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu Fructose-1-6-Diphosphat, sondern auch die Kondensation von Dihydroxyacetonphosphat und dem phosphatfreien D- bzw. L-Glycerinaldehyd, wobei D-Fructose-1-Phosphat bzw. L-Sorbose-1-Phosphat entstehen (Abb.1). L-Sorbose-1-Phosphat hemmt die Hexokinase und damit die gesamte Glykolyse, da die Phosphorylierung der Glucose die Voraussetzung für ihren Umsatz nach dem Embden-Meyerhof-weg ist.

O.Warburg untersuchte die Wirkung von L-Glycerinaldehyd



L-Glycerin-aldehyd

Dihydroxy-aceton Phosphat

L-Sorbose-1-Phosphat

Abb. 1 Aldolase-Reaktion

auf den Stoffwechsel von Ascitestumorzellen, welche für die Untersuchung von Wirkungen verschiedener Substanzen auf den Krebsstoffwechsel ein hervorragendes Versuchsmaterial darstellen, da diese Zellen praktisch ohne Beimengung von normalen Körperzellen erhalten werden können. Es kann also der Stoffwechsel von Krebszellen isoliert gemessen werden. Ascitestumorzellen wurden erstmals von H.Lettré (17) (18) (19) für biochemische Versuche benutzt.

O.Warburg u.a. (35) untersuchten die Wirkung von 0,01 M L-Glycerinaldehyd (und auch D-Glycerinaldehyd) auf den Stoffwechsel von Ascitestumorzellen; sie fanden dabei, daß die Glykolyse weitgehend gehemmt wird, während die Atmung bei der gleichen Konzentration unbeeinflußt blieb.

D-Glycerinaldehyd zeigte bei diesen Stoffwechselversuchen keinerlei Wirkungen. Dennoch wirkten beide Enantiomere des Glycerinaldehydes bei Mäusen cancerostatisch, wenn sie spätestens zwei Tage nach der Impfung mit den Ascitestumorzellen in die Bauchhöhle injiziert wurden.

Untersuchungen von P.Langen, H.Bielka und J.Stahl (15) ergaben, daß die cytostatische Wirkung von D- und DL-Glycerinaldehyd auf der Hemmung der Proteinbiosynthese beruht. Sie schliessen aus ihren Versuchsergebnissen, daß der Glycerinaldehyd die Anheftung der m-RNS an die Ribosomen stört. Auch G.Guidotti (1o) u.a. und J.Drews u.a. (6) sehen den Angriffspunkt in der Proteinbiosynthese. Nach W.Oelkers u.a. (26) wird bereits die DNS- und RNS-Synthese durch D- und L-Glycerinaldehyd gehemmt, wobei die Wirkung von D-Glycerinaldehyd unter anaeroben und aeroben Bedingungen gleich ist, während die Wirkung des L-Glycerinaldehydes bei Anaerobiose erheblich größer ist. Da unter anaeroben Bedingungen die Glykolyse die Energiequelle von Ascitestumorzellen ist, hat der L-Glycerinaldehyd hier seinen entscheidenden Angriffspunkt im Stoffwechsel.

Die Glycerinaldehydwirkung auf die Entwicklung von Tumoren im Tierversuch wird von verschiedenen Arbeitskreisen abweichend beurteilt; seine toxischen Wirkungen erstrecken sich auch auf normale Zellen. So konnten N.Brock und T.Niekamp(5) zwar in vitro eine cyto-

statische Wirkung von D-Glycerinaldehyd feststellen, diese Wirkung wird in vivo jedoch erst mit subletalen Dosen erreicht. Die Erfahrungen von T.Schramm (30) sind ähnlich. Auch K.Motycka und L.Lacko (25) geben starke toxische Nebenwirkungen bei cytostatisch wirksamen Dosen von DL-Glycerinaldehyd bei experimenteller Leukämie an. Versuche von H.J.Lewerenz deuten ebenso darauf hin (20). Bei der Beurteilung dieser abweichenden Resultate muss allerdings berücksichtigt werden, daß in einigen Arbeiten (z.B. P.Langen u.a. (15)) über Bezugsquelle oder Herstellung von Glycerinaldehyd keinerlei Angaben gemacht werden. Dies ist umso bemerkenswerter, da W.Oelkers (26) darauf hingewiesen hat, daß in käuflichen L-Glycerinaldehyd-Präparaten nur 3 % dieser Substanz vorhanden waren und die Eigenherstellung bzw. Untersuchung des Glycerinaldehydes vor der Verwendung daher unerläßlich ist.

2. Aufgabenstellung

O.Warburgs Feststellung, daß Glycerinaldehyd nur bei intraperitonealer Injektion cytostatisch wirksam ist und M.v.Ardennes Befund (2), daß i.v. applizierter Glycerinaldehyd sehr schnell aus dem Blut verschwindet und auch in vitro schon in reinem Blutplasma eine rasche Abnahme seiner Konzentration erfolgt, veranlaßten uns, solche Derivate von Glycerinaldehyd, bei denen die

Aldehydgruppe reversibel verändert ist, herzustellen und ihre Wirkung zu prüfen. Nach einer solchen reversiblen Maskierung der reaktionsfähigen Aldehydgruppe - die sicher verantwortlich für die gefundene rasche Konzentrationsabnahme des Glycerinaldehydes im Plasma ist - schien die Möglichkeit zu bestehen, daß ausreichende Mengen der Substanz in die Zellen geschleust werden konnten. Diese Derivate sollten nach unserer Vorstellung erst im Stoffwechsel so verändert werden, daß der freie Glycerinaldehyd z.B. in der Tumorzelle frei würde. Für diesen Zweck erschienen uns Thiazolidine des Glycerinaldehydes geeignet, da bei diesen eine eventuelle Freisetzung des Aldehydes im Stoffwechsel möglich erschien. Thiazolidine stehen in wässriger Lösung mit ihren Komponenten - Carbonylverbindung und 1,2-Aminothiolen - im Gleichgewicht, dessen Lage je nach den Komponenten sehr verschieden sein kann. Veränderung der einen reaktiven Komponente - beispielsweise durch Oxydation der SH-Gruppen - kann die Spaltung entsprechend fördern. Als Aminothiole zur Thiazolidinbildung mit L-Glycerinaldehyd schienen uns L-Cystein und D-Penicillamin besonders geeignet, da beide Substanzen auch bei Gabe von hohen Dosen keine oder nur geringfügige toxische Wirkungen zeigen.

Die Thiazolidinbildung von L-Cystein mit verschiedenen Aldehyden untersuchte M.P.Schubert (28). Er zeigte auch durch Untersuchung des Verhaltens der Thiazolidine

gegen SH-Reagenzien, daß eine teilweise Spaltung in die Komponenten beim Auflösen der Substanzen stattfand, die je nach der Carbonylverbindung ein sehr unterschiedliches Ausmaß besaß. L.Eldjarn u.a. (8) haben gezeigt, daß Cysteamin mit Glycerinaldehyd reagiert, ohne jedoch das Kondensationsprodukt zu isolieren. Sykes und Todd (32) stellten aus dem Diacetal von DL-Glycerinaldehyd und DL-Penicillamin ein Thiazolidin durch Erhitzen auf 80° C her.
Wir haben zunächst die Reaktion von L-Glycerinaldehyd mit L-Cystein bzw. D-Penicillamin durch Messungen (optische Drehung, Entwicklung von Wasserstoffionen) verfolgt und konnten auf Grund dieser Messungen schonende Bedingungen für die präparative Herstellung der Thiazolidine angeben.
Die Wirkung dieser Thiazolidine auf den Stoffwechsel von Ascitestumorzellen haben wir in vitro untersucht. Wir beschränkten unsere Untersuchungen auf die Thiazolidine des L-Glycerinaldehydes, da die Wirkung des bei der Spaltung der Thiazolidine freiwerdenden L-Glycerinaldehydes auf die Glykolyse methodisch einfach festzustellen ist.

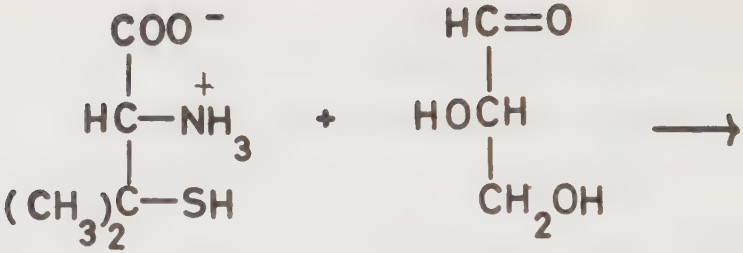
II. Ergebnisse und Diskussion

1. Messung der Geschwindigkeit der Reaktion von L-Glycerinaldehyd mit L-Cystein bzw. D-Penicillamin im lichtelektrischen Polarimeter

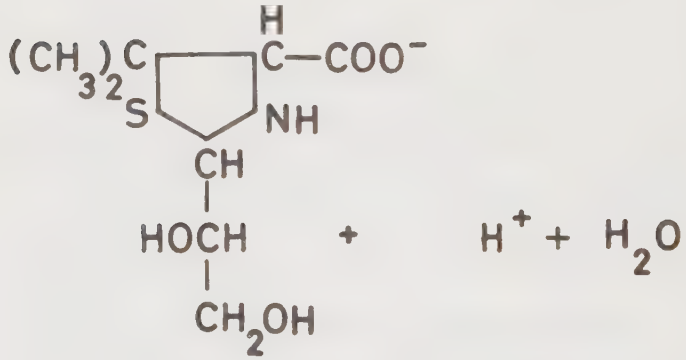
Zur Prüfung der Reaktionsfähigkeit von L-Glycerinaldehyd mit L-Cystein bzw. D-Penicillamin und zur Messung der Geschwindigkeit der Reaktion haben wir zwei Methoden benutzt.

Die erste war die fortlaufende Messung der Winkel, um die die Schwingungsebene von polarisiertem Licht durch Lösungen, die L-Glycerinaldehyd und eines der Aminothiole enthielten, gedreht wird. Die spezifische Drehung von L-Glycerinaldehyd bei der D-Linie des Natriumlichtes ist klein ($(\alpha)_D = -8{,}4^o$). Bei Verwendung einer Meßstrahlung mit einer Wellenlänge von 365 nm ist sie etwa doppelt so groß; aber auch bei dieser Wellenlänge beträgt der Drehwinkel bei einer Lösung, die 0,01 M L-Glycerinaldehyd und 0,01 M L-Cystein (oder D-Penicillamin) enthält, bei einer Schichtdicke von 10 cm nur etwa $0{,}1^o$ (bzw. $0{,}3^o$). Nach etwa einer Stunde betrugen die Drehwinkel circa $0{,}9^o$, was anzeigte, daß eine Reaktion stattgefunden hatte.

Die so erhebliche Vergrößerung der Drehwinkel ließ die Entstehung eines neuen Asymetriezentrums wahrscheinlich erscheinen, was im Einklang mit der Bildung eines Thiazolidins (das C-Atom der Aldehydgruppe wird asymmetrisch, vgl. Abb.2) steht, während bei der Bildung der



D(-) Penicillamin L-Glycerinaldehyd

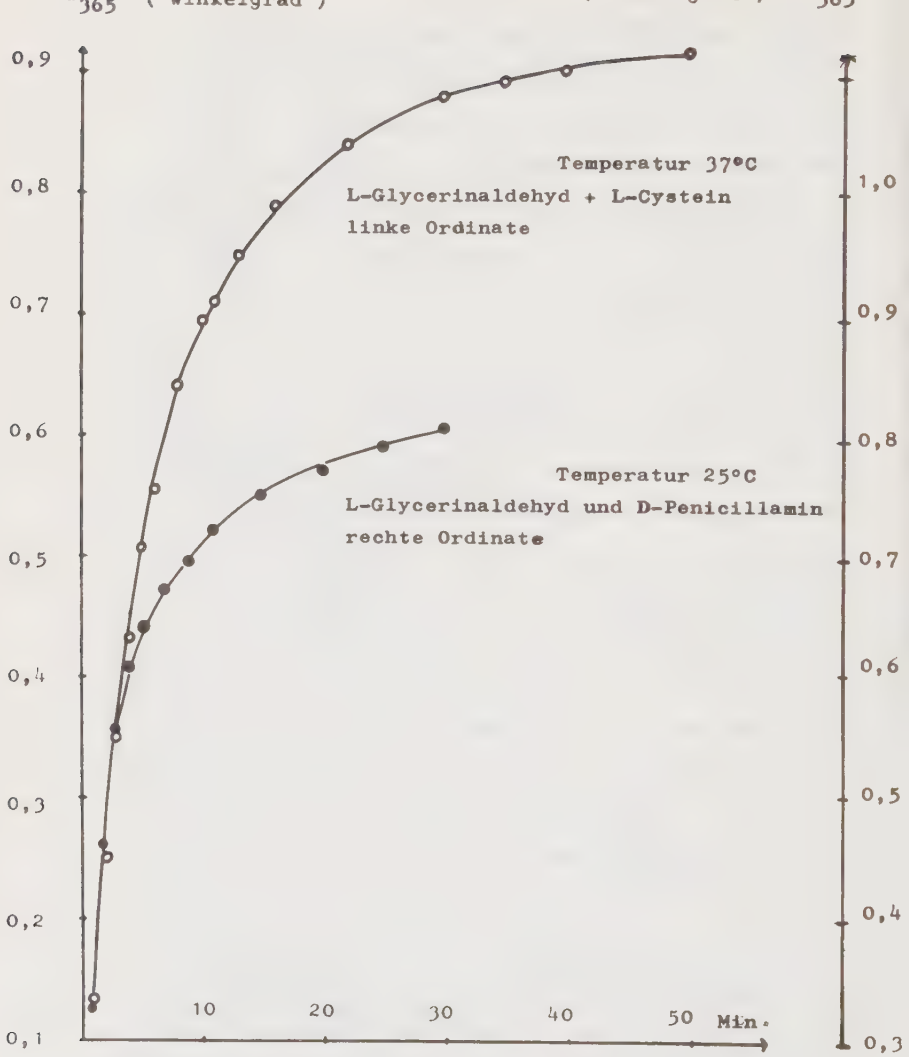


Thiazolidin

Abb. 2

Thiazolidinbildung aus L-Glycerinaldehyd und D-Penicillamin

anderen möglichen Reaktionsprodukte aus L-Glycerinaldehyd und Aminothiolen - den Schiff'schen Basen und den Mercaptalen - keine neuen asymmetrischen C-Atome entstehen. Mit einem empfindlichen lichtelektrischen Polarimeter kann die Kinetik der Drehwinkeländerungen und damit der Reaktion bestimmt werden (vgl. Abb.3 und Tab.1 und 2). Da eine Reaktion auch noch nachzuweisen war, wenn die Konzentrationen der Partner nur 1 mM betrugen, muß das Gleichgewicht weitgehend auf der Seite der Thiazolidinbildung liegen. Die Messungen bei 10 mM benutzten wir zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten bei der Reaktion von L-Glycerinaldehyd mit L-Cystein. Wir setzten äquimolare Konzentrationen der Reaktionspartner ein; dabei ist bei einer bimolekularen Reaktion der Reziprokwert der Konzentration für jedes Ausgangsprodukt eine lineare Funktion der Zeit und der tg des Winkels dieser Geraden mit der Abszisse entspricht der Geschwindigkeitskonstanten, die wir für diese Reaktion zu 0,0025 $\frac{1}{\text{mMol x Min.}}$ berechneten. Die Konzentration der Ausgangsprodukte zur Zeit t ist proportional zur Differenz der sich schließlich einstellenden Enddrehung und der Drehwinkel zur Zeit t. Die reziproken Werte dieser Differenz gegen die Zeit aufgetragen, müßten bei einem reinen bimolekularen Reaktionsverlauf auf einer Geraden liegen. Das ist hier aber nur während der ersten 5 Minuten der Fall, gegen Ende der Reaktion ist die Kurve sogar sehr erheblich gekrümmt. Das läßt



Drehwinkeländerungen [365 nm] bei der Reaktion von L-Glycerinaldehyd mit L-Cystein bzw. D-Penicillamin in äquimolaren Lösungen der Konzentrationen 0,01 M in 0,2 M Phosphatpuffer , pH 7,3 .

Tab. 1

Kinetik der Reaktion von L-Cystein mit L-Glycerinaldehyd in 0,2 M Phosphatpuffer bei pH 7,3 und 25°C. Messung der Drehwinkel der Schwingungsebene von monochromatischem polarisierten Licht der Wellenlänge 365 nm. Konzentration der Reaktionspartner: 10 mM, 5 mM, 1 mM .

Min. α_{365}	10 mM	5 mM	1 mM
1	-0,135	-0,045	-0,025
2	-0,250	-0,085	-0,025
3	-0,350	-0,115	-
4	-0,430	-0,145	-
5	-0,505	-0,175	-0,025
6	-0,550	-0,200	-
7	-0,505	-0,220	-
8	-0,640	-0,240	-
9	-0,670	-0,260	-
10	-0,695	-0,275	-0,035
11	-0,710	-0,285	-
12	-0,735	-0,300	-
13	-0,750	-0,310	-
14	-0,780	-0,330	-
15	-0,785	-	-0,040
16	-0,790	-0,335	-
17	-0,795	-	-
18	-0,805	-0,350	-
19	-0,815	-	-
20	-0,820	-0,355	-0,o50
25	-0,850	-0,380	-
30	-0,880	-0,400	-0,060
35	-0,890	-o,405	-
40	-0,900	-0,410	-0,075
50	-0,915	-0,425	-0,075
Endwert	-0,925	-0,425	-0,075

Tab. 2 (vgl. Tab. 1)

Reaktionsgeschwindigkeit der Kondensation von L-Glycerinaldehyd mit D-Penicillamin. Meßtechnik und Konzentrationen wählten wir hier wie bei dem zuvor beschriebenen Versuch. (Temperatur 37°C.)

Min. α_{365}	10 mM	5 mM	1 mM
1	0,325	0,145	-
2	0,460	0,200	-
3	0,555	0,230	-
4	0,605	0,245	0,020
5	0,635	0,255	-
6	0,650	0,280	0,025
7	0,670	0,290	-
8	0,685	0,400	0,030
9	0,695	0,310	-
10	0,710	0,320	0,035
11	0,720	-	-
12	0,730	0,330	0,040
13	0,735	0,335	-
14	-	-	0,045
15	0,750	0,340	-
16	-	-	0,050
17	0,760	0,345	-
18	-	-	0,050
20	0,770	-	-
22	-	0,355	-
24	-	0,360	-
25	0,790	-	0,055
26	-	0,370	-
30	0,865	-	0,055
Endwert	0,865	0,390	0,055

darauf schließen, daß der Reaktionsverlauf nicht einheitlich ist und daß Neben- oder Folgereaktionen eintreten.

2. Verfolgen der Reaktion durch Titration der dabei entstehenden Wasserstoff-Ionen

Als zweite Methode zur Verfolgung dieser Reaktion benutzten wir eine titrimetrische Methode, die G. Weitzel u.a. (33) bei der Untersuchung der Reaktion von Cystein mit reduzierenden Zuckern angegeben haben. Diese Methode beruht auf folgendem Prinzip: Die Basizität des Stickstoffes im Thiazolidinring ist erheblich geringer als im Cystein (pK-Wert des Thiazolidin-Stickstoffes beträgt 5,0; pK-Werte der Amino- bzw. SH-Gruppe von Cystein bzw. Penicillamin 8,6 bzw. 8,0)+) Bei der Kondensation im Bereich von pH 6,5 wird daher ein Proton abgegeben und kann mit Lauge titriert werden (Abb. 2). die für die Aufrechterhaltung des Neutralpunktes erforderliche Laugenmenge gegen die Zeit aufgetragen zeigt den Reaktionsablauf (Abb. 4) . Die Ergebnisse dieser Messungen erlauben eine Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten

---

+) Eine Zuordnung der ermittelten pK-Werte bei Cystein und Penicillamin zur N^+H_3- bzw. SH-Gruppe ist aus Gleichgewichtsmessungen wegen des raschen direkten Übergangs des Protons zwischen diesen Gruppen nicht möglich. (vgl. Eigen) (7)

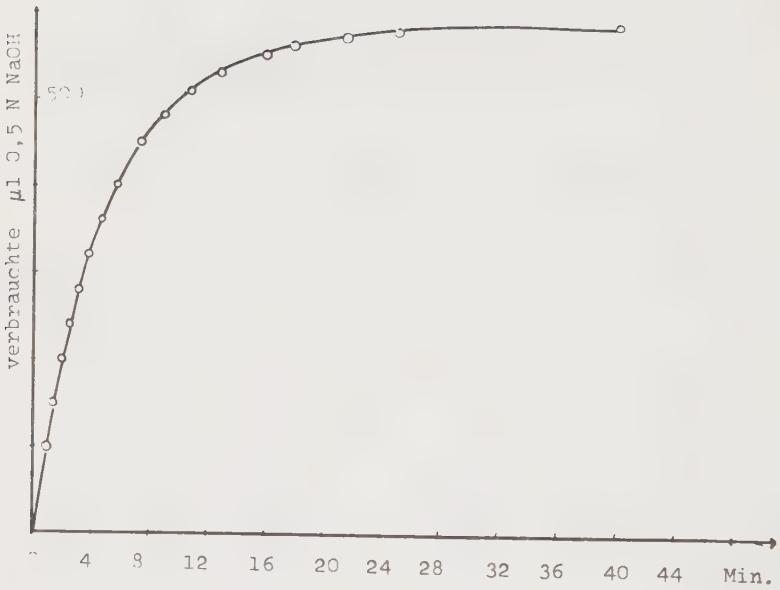


Abb. 4

H^+-Bildung bei der Reaktion von L-Glycerinaldehyd mit D-Penicillamin in einer Lösung, die 0,059 Mol/ l von beiden Substanzen enthielt. Temperatur 25° C, pH 6,5

Tab. 3

Wertepaare zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion von L-Glycerinaldehyd mit D-Penicillamin (0,058 M)

Zeit		Reziprokwert der Konzentration eines Ausgangsproduktes in
Min.	Sek.	1/ mMol
0	0	0,017
-	55	0,020
1	20	0,023
2	8	0,028
3	-	0,033
4	5	0,042
5	4	0,050
6	15	0,063
7	20	0,077
8	20	0,091
9	25	0,110
10	-	0,130
11	40	0,170
12	50	0,200
14	5	0,250
16	-	0,330
17	50	0,500
21	30	1,000
25	-	2,000

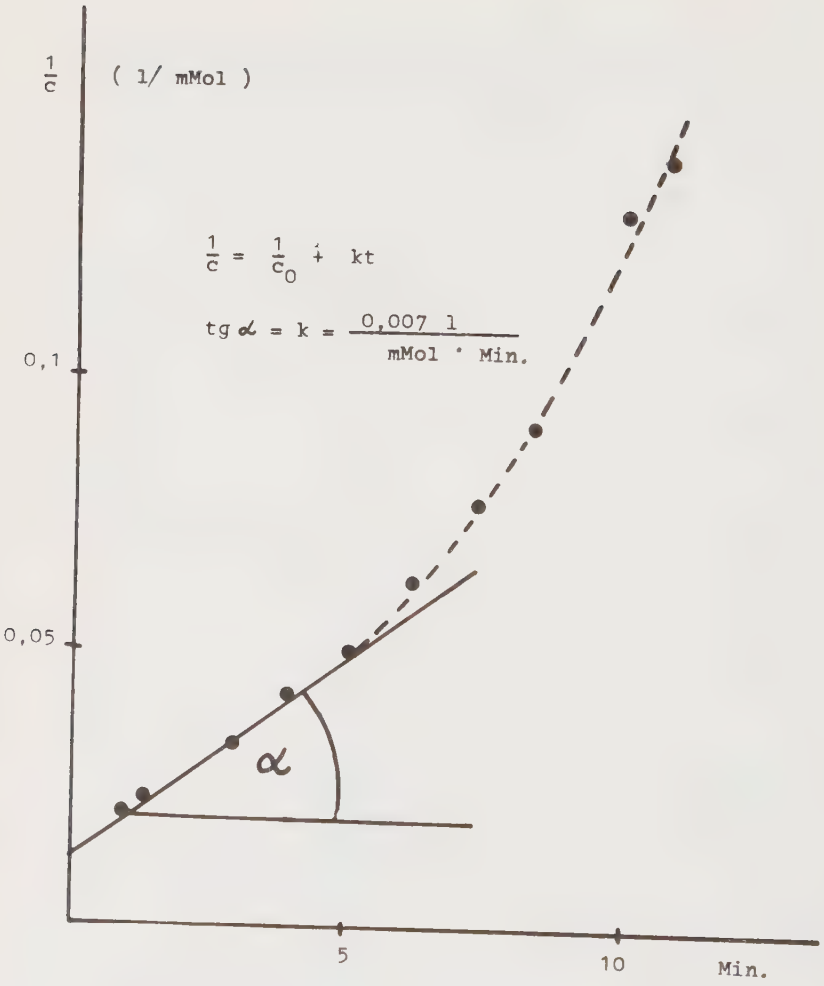


Abb. 5
Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion von L-Glycerinaldehyd mit D-Penicillamin. Die Konzentration der verbleibenden Ausgangssubstanz ergibt sich aus der Differenz des maximalen Laugeverbrauchs und dem jeweiligen Laugeverbrauch zur Zeit t.

nach dem oben angegebenen Verfahren, wenn der Reziprokwert der Differenz des Laugeverbrauches nach völligem Ablauf der Reaktion und des Laugeverbrauches zur Zeit t gegen t aufgetragen werden (Tab. 3, Abb. 5). Auch hier liegen die Punkte nur etwa während der ersten fünf Minuten auf einer Geraden. Aus dem tg des Winkels dieser Geraden mit der Abszisse berechneten wir die Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion von L-Glycerinaldehyd mit D-Penicillamin zu 0,007 $\frac{1}{\text{mMol x Min.}}$

3. Präparative Herstellung der Thiazolidine

Die voranstehenden Untersuchungen haben gezeigt, daß L-Glycerinaldehyd mit L-Cystein bzw. D-Penicillamin bereits in sehr verdünnten, wäßrigen Lösungen bei Raumtemperatur oder 37° C und bei pH-Werten um den Neutralpunkt, miteinander reagieren. Die bei der Herstellung von L-Glycerinaldehyd aus Sorbose anfallenden wäßrigen Lösungen können daher ohne vorangehende Reindarstellung von L-Glycerinaldehyd, (die schwierig und verlustreich ist), zur präparativen Herstellung der Thiazolidine benutzt werden. Die nach A.S.Perlin und C.Brice (27) erhaltenen titrierten Lösungen von L-Glycerinaldehyd, die noch die zur Verseifung benutzte Mineralsäure und die entstandenen organischen Säuren enthielten, wurden mit der äquivalenten Menge der Hydrochloride von L-Cystein bzw. D-Penicillamin versetzt und zur Bindung der Salz-

säure, und der bei der Reaktion entstehenden Wasserstoffionen, ein Überschuß von Pyridin zugegeben. Die Lösungen wurden nach Beendigung der Reaktion (24 - 48 Std.) im Vakuum zur Trockne gedampft und der Rückstand aus Alkohol kristallisiert.

4. Charakterisierung der hergestellten Thiazolidine

(Verbindung aus L-Glycerinaldehyd und L-Cystein
= Thiazolidin I)
(Verbindung aus L-Glycerinaldehyd und D-Penicillamin
= Thiazolidin II)

Zur Kontrolle, ob tatsächlich die gewünschten Thiazolidine entstanden waren, wurden Elementaranalysen von den umkristallisierten Substanzen durchgeführt, deren Ergebnisse mit der Theorie übereinstimmten. (vgl. "Beschreibung der Versuche" III, 7). Zur weiteren Prüfung wurden ausserdem die pK-Werte durch Aufnahme einer pH-Titrationskurve ermittelt; die Werte betragen 5,15 für Thiazolidin I bzw. 5,00 für Thiazolidin II. (Abb. 6). Das beweist, daß die Aminogruppe an der Reaktion beteiligt ist. Da die Lösungen der Reaktionsprodukte andererseits mit Nitroprussidnatrium keine Farbreaktion ergeben, die auf freie SH-Gruppen schließen läßt, sind auch die SH-Gruppen an der Reaktion beteiligt. Diese Befunde stehen also mit der angenommenen Thiazolidinbildung in Einklang; mit dem Aldehydreagenz Dimedon trat ebenfalls keine Reaktion ein, was die Abwesenheit

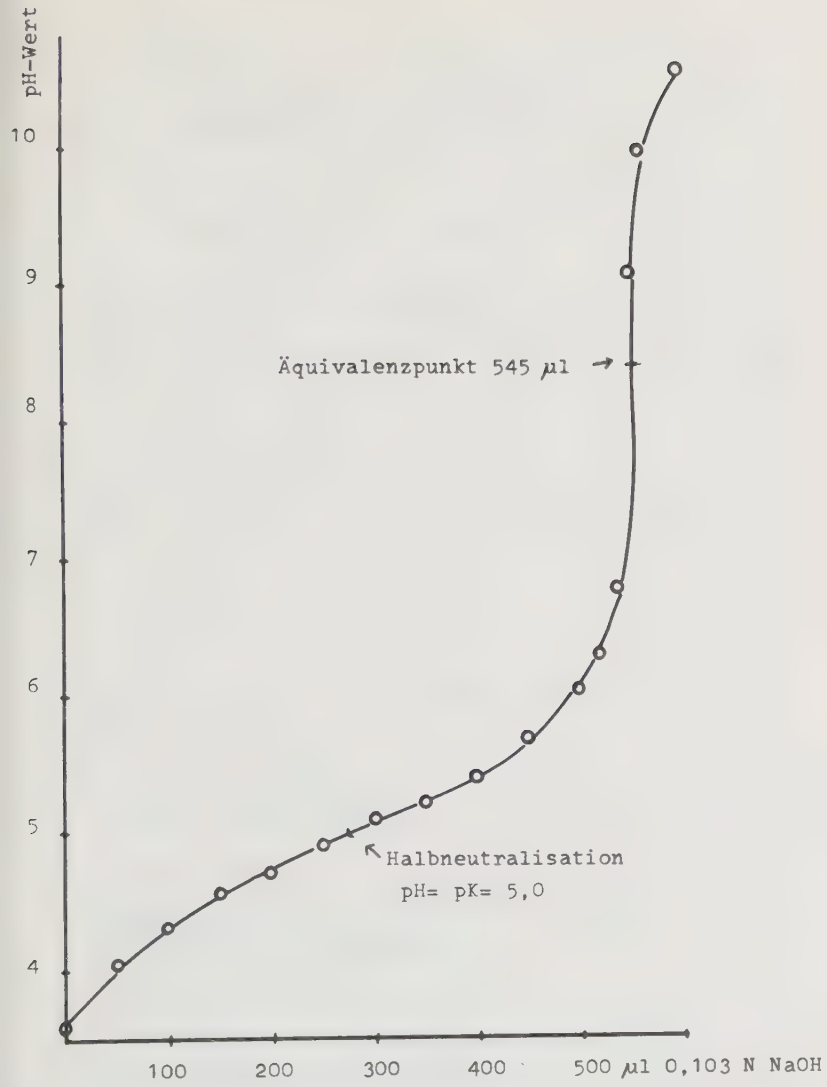


Abb. 6

pH-Titrationskurve von 10 ml 11,2 mM Thiazolidinlösung (aus L-Glycerinaldehyd und D-Penicillamin) in 0,1 N KCl-Lösung

freier Aldehydgruppen zeigt. Die frisch bereitete wäßrige Lösung des Kondensationsproduktes aus L-Glycerinaldehyd und D-Penicillamin zeigt Mutarotation, was mit der Entstehung eines umlagerungsfähigen Asymmetriezentrums bei der Thiazolidinbildung in Einklang steht.

Die Bestimmung des Thiazolidinschwefels (31) erfolgte mit p-Chlormercuribenzoat. Wir zeigten in einer früheren Arbeit (31), daß p-Chlormercuribenzoat - das von P.D. Boyer (4) zur Bestimmung freier Sulfhydrylgruppen eingeführt wurde - auch etwas langsamer mit einfachen Thiazolidinen unter Bildung des bei 250 nm stark absorbierenden Mercaptids reagiert. Mit Mercaptalen tritt dagegen keine oder nur eine schleichende Reaktion ein (13).

Zur Bestimmung wurde zunächst der genaue Titer einer etwa 25 µM p-Chlormercuribenzoatlösung durch Titration mit einer 0,502 mM Cysteinlösung bestimmt (Tab. 4a). Der Äquivalenzpunkt wurde graphisch ermittelt und in einem nächsten Versuch die gleiche p-Chlormercuribenzoatmenge mit etwa der halben äquivalenten Menge des Thiazolidins versetzt und die Extinktionsänderung zunächst in Minutenabständen gemessen. Nach Konstantwerden der Extinktion wurde das überschüssige p-Chlormercuribenzoat mit 0,502 mM Cysteinlösung zurücktitriert, wobei der Äquivalenzpunkt wie oben ermittelt wurde (Tab.4b).

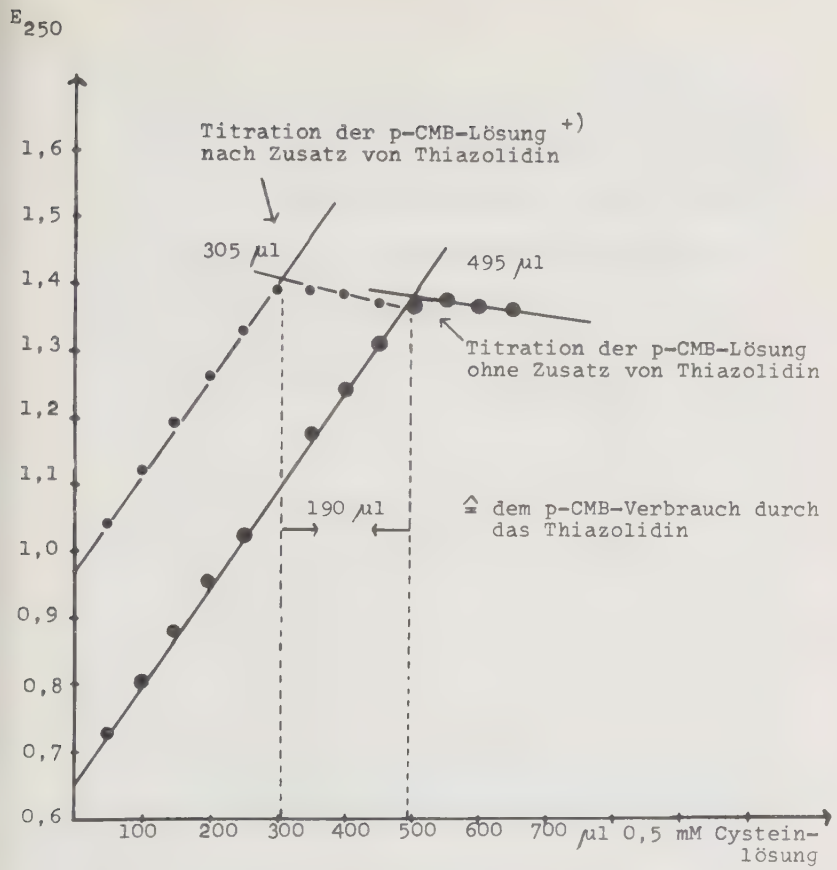


Abb. 7

Ermittlung des vom Thiazolidin verbrauchten p-Chlormercuribenzoat

+) p-CMB = p-Chlormercuribenzoat

Abbildung 7 zeigt die Ermittlung des vom Thiazolidin verbrauchten p-Chlormercuribenzoates, das der Differenz der beiden Bestimmungen entspricht.

Tab. 4

Bestimmung des Thiazolidinschwefels mit p-Chlormercuri-benzoat-Lösung, pH 4,6.

a) Titerstellung mit 0,502 mM Cysteinlösung

µl 0,502 mM Cysteinlösung	E_{250}
0	0,694
50	0,730
100	0,808
150	0,880
200	0,956
250	1,025
300	1,102
350	1,176
400	1,245
450	1,315
500	1,380
550	1,380
600	1,370
650	1,365

b) Rücktitration der eingestellten p-Chlormercuri-benzoatlösung nach Zusatz einer gemessenen Menge Thiazolidin II

µl 0,502 mM Cysteinlösung	E_{250}
0	0,971
50	1,049
100	1,120
150	1,193
200	1,261
250	1,328
300	1,393
350	1,390
400	1,380
450	1,375

Zu Tab. 4b

Zusatz: 22,45 µg Thiazolidin II (aus L-Glycerinaldehyd und D-Penicillamin). Nach Konstantwerden der Extinktion wurde erneut titriert (vgl. Tab. 4a).

c) Rücktitration nach Zusatz einer gemessenen Menge Thiazolidin I (vgl. Tab. 4b)

µl 0,502 mM Cysteinlösung	E_{250}
0	0,975
50	1,047
100	1,125
150	1,190
200	1,262
250	1,330
300	1,338
350	1,428
400	1,415
450	1,408
500	1,404

Zusatz: 18,35 µg Thiazolidin I (aus L-Glycerinaldehyd und L-Cystein).

Berechnung des Thiazolidinschwefels

a) von 22,45 µg der Verbindung aus L-Glycerinaldehyd und D-Penicillamin

eingesetzt	0,2485 µMol	p-CMB
zurücktitriert	0,1468 "	"
Reaktion mit Thiazolidin II	0,1017 "	"

Das entspricht 13,65 % Schwefel (Theorie 14,05 %).

b) von 18,35 µg der Verbindung aus L-Glycerinaldehyd und L-Cystein

eingesetzt	0,2485 µMol	p-CMB
zurücktitriert	0,1535 "	"
Reaktion mit Thiazolidin I	0,0950 "	"

Das entspricht 16 % Schwefel (Theorie 16,60 %).

5. Wirkung der Thiazolidine auf die aerobe Glykolyse von Ascitestumorzellen

Wir untersuchten zunächst die Wirkung der von uns hergestellten Thiazolidine aus L-Glycerinaldehyd und D-Penicillamin (Thiazolidin II) bzw. L-Glycerinaldehyd und L-Cystein (Thiazolidin I) auf die aerobe Glykolyse von Ascitestumorzellen, da diese nach O.Warburg ein Charakteristikum für Tumorzellen ist. Zunächst wurden die Zellen mit 50 mM Thiazolidin aus L-Glycerinaldehyd und L-Cystein bzw. D-Penicillamin in Abwesenheit von Glucose 5 Stunden vorinkubiert. Diese Vorinkubation erfolgte in Erlenmeyerkolben, die im Warburgapparat auf 37°C temperiert und geschüttelt wurden. Der Gasraum enthielt 5 % CO_2/ Luft. Nach 5-stündiger Vorinkubation wurde in einer Probe jedes Ansatzes Milchsäure bestimmt und dann den Versuchsansätzen Glukose zugesetzt. Nach einer weiteren Stunde Inkubation unter den gleichen Bedingungen wurde wiederum Milchsäure bestimmt. Die Bestimmung der Milchsäure erfolgte in enteiweißten Proben mit dem optischen Test nach der von H.Holzer u.a. (12)

angegebenen Methode mit APAD (Acetyl-Pyridin-Adenin-Dinucleotid) und LDH (Lactatdehydrogenase) bzw. mit NAD und LDH nach H.J.Hohorst (11) (vgl. Beschreibung der Versuche (S. 61 - 64). Tabelle 5 zeigt, daß die Milchsäurebildung durch 50 mM Thiazolidine deutlich gehemmt wird, wobei das Thiazolidin II wirksamer ist als das Thiazolidin I. Aus diesem Grunde haben wir in den folgenden Versuchen für die aerobe Glykolyse nur das Thiazolidin II eingesetzt und es auf seine Wirkungen untersucht. Tabelle 6 zeigt den Einfluß dieses Thiazolidins auf die aerobe Glykolyse von Ascitestumorzellen bei verschiedenen Konzentrationen und bei verschiedenen Vorinkubationszeiten. Die Versuchsergebnisse in dieser Tabelle zeigen, daß bei 40 mM Inhibitor die Glykolyse zu 40 bzw. 50 % gehemmt wird. Eine Verlängerung der Vorinkubationsperiode auf 9 Stunden erhöht die Hemmwirkung nicht. Auch bei 10 mM Thiazolidin ist die Hemmung mit 21 bzw. 22 % noch deutlich.
In einem weiteren Versuch prüften wir, ob die gefundene Hemmung des Thiazolidin II auf die aerobe Glykolyse durch die Abwesenheit eines exogenen Substrates während der langen Vorperiode mitbedingt war. Bei Zusatz eines exogenen Substrates während der Vorinkubation (1 µMol Lactat pro ml) ergaben sich, verglichen mit den vorangehenden Werten, die gleichen Ergebnisse. Diese sind

Tab. 5

Hemmung der aeroben Glykolyse durch Thiazolidin I (aus L-Glycerinaldehyd und L-Cystein) und Thiazolidin II (aus L-Glycerinaldehyd und D-Penicillamin)

Inhibitoren	-	50 mM Thiazolidin I	50 mM Thiazolidin II
ΔE_{366}-Werte für 24 µl Ansatz nach 1 Stunde Glykolyse (im Testvolumen von 2,73 ml)	0,328	0,200	0,110
µMol gebildete Milchsäure pro µl Zellen und Stunde	0,120	0,073	0,040
$\varkappa_M^{Luft}$ +)	15,2	9,2	5,1
% Hemmung	-	39,5	66,4

Ansatz: 10 ml 0,01 M Phosphatpuffer (pH 7,4), 0,018 M Natriumbicarbonat, 0,9% Natriumchlorid, 340 µl Ascitestumorzellen, Gasraum: 5% CO_2/Luft, Vorinkubation bei 37°C 5 Std., danach Zugabe von 0,5 ml 4%iger Glucose. Frequenz 100/Min., Amplitude 5 cm. Die eine Stunde mit Glucose inkubierte Probe wurde mit Perchlorsäure enteiweißt und Milchsäure im Zentrifugat mit APAD und LDH bestimmt.

+) $\varkappa_M^{Luft}$ wird nach O.Warburg als $\frac{mm^3 \text{ Milchsäure}}{\text{Std.x mg Zelltrockensubstanz}}$ definiert, 22,4 mm^3 Milchsäure = 1 µMol.

Tab. 6

Wirkung des Thiazolidin II (Verbindung aus L-Glycerinaldehyd und D-Penicillamin) auf die aerobe Glykolyse von Ascitestumorzellen

Inhibitorkonzentration	–	10 mM	20 mM	40 mM
ΔE_{366} korrigiert (24 µl) (Lactat-Bestimmung)	0,295 * 0,250	0,230 * 0,195	0,213 * –	0,150 * 0,145
Gebildetes Lactat in µMol pro ul Zellen und Std.	0,117 * 0,105	0,091 * 0,082	0,085 * –	0,060 * 0,061
Q_M^{Luft})+	14,8 * 13,3	11,5 * 10,4	10,8 * –	7,6 * 7,73
% Hemmung	–	22 * 21	27 * –	49 * 42

In allen Kolben befanden sich 10 ml Ansatz:
0,01 M Phosphatpuffer (pH 7,4), 0,018 M $NaHCO_3$, 0,9 % NaCl, Cytokrit 34 µl/ml. Gasraum 5 % CO_2/Luft, Vorinkubation bei 37°C, Frequenz 100/Min., Amplitude 5 cm. Nach 5 Stunden bzw. 9 Stunden (*) wurden 0,5 ml einer 4 %igen Glucoselösung zugesetzt und nach 1-stündiger Glykolyse in den mit Perchlorsäure enteiweißten Proben die Milchsäure bestimmt.

)+ vgl. Fußnote S.27

in Tabelle 7 zusammengestellt. Die Milchsäurebestimmung am Ende der Vorinkubationsperiode zeigt, daß das zugesetzte Lactat praktisch vollständig veratmet worden war.

Unsere Versuche haben gezeigt, daß die Thiazolidine I und II einen deutlichen Hemmeffekt auf die aerobe Glykolyse von Ascitestumorzellen ausüben.

In den folgenden Versuchsreihen wollten wir nun klären, ob die anaerobe Glykolyse und die Atmung durch die Zugabe dieser Thiazolidine zu Ascitestumorzellen ebenfalls beeinflußt werden.

Tab. 7

Hemmung der aeroben Glykolyse durch das Thiazolidin aus L-Glycerinaldehyd und D-Penicillamin in verschiedenen Konzentrationen bei Zusatz von 1 µMol Lactat pro ml, als Substrat für die Vorperiode.

Inhibitor-konzentration	-	10 mM	20 mM	40 mM
ΔE_1 (24 µl Ansatz) nach Vorinkubation	0,005	0,0	0,0	0,0
ΔE_2 (24 µl Ansatz) nach Glykolyse	0,255	0,195	0,128	0,145
$\Delta E_2 - \Delta E_1$	0,250	0,195	0,128	0,145
µMol gebildete Milchsäure pro µl Zellen	0,076	0,059	0,038	0,044
% Hemmung	-	21,4	49,2	41,3

Ansatz: 10 ml 0,01 M Phosphatpuffer (pH 7,4),Ø,018 M Natriumbicarbonat, 0,9% Natriumchlorid, 410 µl Ascitestumorzellen. Gasraum 5% CO_2/Luft, Vorinkubation bei 37°C 9 Stunden unter Zugabe von 1 µMol Lactat pro ml; danach Zugabe von 0,5 ml 4%iger Glucose. Frequenz 100/Min., Amplitude 5 cm. Nach 9-stündiger Vorinkubation wurde zu jeweils 1 ml der Proben 1 ml 6%iger Perchlorsäure gegeben und die Milchsäurebestimmung mit APAD und LDH in 48 µl Überstand der enteiweißten Proben (= 24 µl Ansatz) vorgenommen.

6. Wirkung der Thiazolidine auf die anaerobe Glykolyse von Ascitestumorzellen

Die Wirkung der Thiazolidine auf die anaerobe Glykolyse wurde für verschiedene Praeinkubations- und Glykolysezeiten bestimmt. Die Wirkung von Glycerinaldehyd wurde zum Vergleich ebenfalls gemessen. Die Milchsäurebestimmungen wurden mit NAD (11) und APAD (Acetyl-Pyridin-Adenin-Dinucleotid) (12) durchgeführt. Beide Methoden gaben übereinstimmende Resultate.

Tabelle 8 fasst die Ergebnisse zusammen. Während L-Glycerinaldehyd stets eine ausgeprägte Hemmung auf die Glykolyse ausübt, am stärksten bei einer Praeinkubationsdauer von 2 Stunden und einer Glykolysezeit von 1 Stunde, zeigt Thiazolidin I unter anaeroben Bedingungen keinerlei Einfluß, unabhängig von der Praeinkubationsdauer und der Glykolysezeit.

Nach diesem Vorversuch wurde die Wirkung des Thiazolidin II das unter aeroben Bedingungen eine ausgeprägte Hemmung auf die Milchsäurebildung zeigte, in unterschiedlichen Konzentrationen auf die anaerobe Glykolyse während 6 Stunden manometrisch verfolgt. In jedem Manometriegefäß befanden sich in einem Volumen von 2,8 ml Lösung 6 mg Glucose, 2,5 ml einer Suspension von Ascitestumorzellen (3,1 mg Zelltrockensubstanz) in inaktiviertem Ascitesserum.

Tab. 8

Wirkung von L-Glycerinaldehyd und von Thiazolidin I (aus L-Glycerinaldehyd und L-Cystein) auf die anaerobe Glykolyse von Ascitestumorzellen. Die Glykolyse wurde durch Zugabe von 20 mg Glucose zu 10 ml Ansatz gestartet.

Inhibitor	Glykolysedauer	Praeinkubationszeit	
	1 Std.	1 Std.	2 Std.
		gebildete µMol Lactat/µl Zellen	
-	"	0,0968	0,0930
L-Glycerinaldehyd (6,4 mM)	"	0,0277	0,0060
Thiazolidin I (20 mM)	"	0,1025	0,0939
	2 Std.		
-	"	0,1784	-
L-Glycerinaldehyd (6,4 mM)	"	0,1115	-
Thiazolidin I (20 mM)	"	0,1840	-

Es zeigte sich (Tab. 9 und 10), daß sowohl 27 mM als auch 54 mM Thiazolidin II keine Hemmung auf die anaerobe Glykolyse ausübten, auch nicht bei einer Versuchsdauer von 6 Stunden.
Aus dem Thiazolidin kann also unter anaeroben Bedingungen nur so wenig L-Glycerinaldehyd freigesetzt worden sein, daß das daraus entstehende L-Sorbose-1-Phosphat zur Hemmung der Glykolyse nicht ausreicht (vgl. auch Abb. 8).

Tab. 9

Einfluß von Thiazolidin aus L-Glycerinaldehyd und D-Penicillamin auf die anaerobe Glykolyse von Ascitestumorzellen.

Gefäßnummer	2	3	4	5	6	7
K_M +)	1,93	1,82	1,78	1,87	1,71	1,83
V_G ++)	14,90	13,21	11,50	12,14	12,96	13,36
µl H_2O	200	200	100	100	-	-
µl Thiazolidin-II-lösung (0,75 M)	-	-	100	100	200	200
Thiazolidinkonzentration im Ansatz	-	-	27 mM	27 mM	54 mM	54 mM

x) Gefäßkonstante zur Berechnung der gebildeten Milchsäure
xx) Volumen des Gasraumes

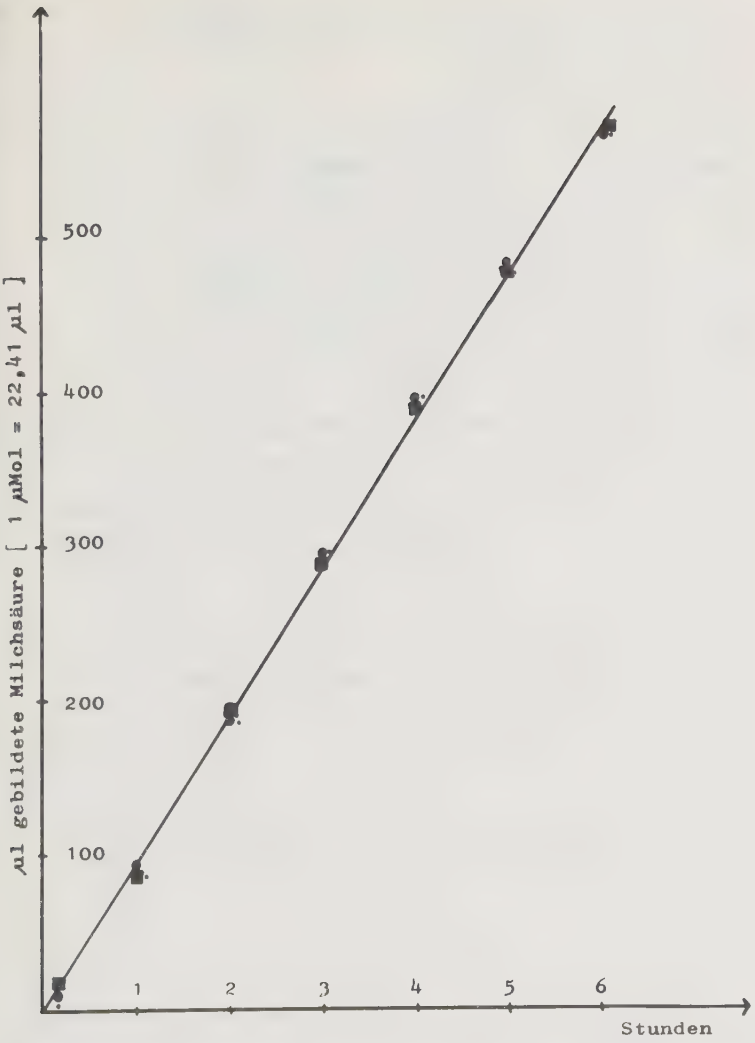
In jedem Manometriegefäß befanden sich in einem Gesamtvolumen von 2,76 ml 6 mg Glucose und 17,8 µl Ascitestumorzellen (entsprechend 3,1 mg Trockensubstanz) Temperatur 37°C, Amplitude 2 cm, Gasraum 5 % CO_2/Luft, Frequenz 100/Min, (2 Minuten vor jeder Ablesung wurde die Frequenz auf 180/Min gesteigert, um ein Gleichgewicht zwischen Gasraum und Flüssigkeit herzustellen). Die Thiazolidin-II-Lösung (0,75 M) wurde nach 56 Min. eingekippt; vor Versuchsbeginn wurde 15 Min. bei geöffnetem Hahn mit dem Gasgemisch durchströmt.

(Fortsetzung nächste Seite)

Tab. 10

Gebildete µl Milchsäure (22,4 µl Milchsäure = 1 µMol)

Minuten ↓ / Gefäß-Nr. →	2	3	4	5	6	7
10	10,6	12,7	4,5	6,5	2,6	-8,2
20	23,2	25,4	19,5	18,7	15,4	1,8
30	40,5	44,6	39,0	37,4	34,2	15,6
40	56,0	59,4	57,0	54,2	48,7	32,0
50	71,4	78,3	76,5	71,0	51,0	49,4
60	86,9	94,6	96,0	93,0	88,9	73,0
70	104,2	111,0	115,0	108,5	104,0	87,8
80	121,6	129,0	135,0	123,4	121,0	106,0
90	139,0	146,0	155,0	140,0	137,0	123,0
100	158,3	167,0	174,0	159,0	156,0	141,0
110	175,6	186,0	195,0	174,0	171,0	157,0
120	191,0	202,0	215,0	187,0	190,0	175,7
130	208,4	220,0	234,0	202,0	205,0	194,0
140	225,8	238,0	256,0	223,0	222,0	212,3
150	240,3	255,0	276,0	234,0	238,0	231,0
160	255,7	270,0	295,0	253,0	256,0	250,0
170	276,0	292,0	317,0	277,0	277,0	273,0
180	293,0	30§,0	338,0	297,0	296,0	294,0
190	313,0	331,0	363,0	310,0	318,0	311,0
200	328,0	346,0	381,0	336,0	331,7	328,0
210	344,0	364,0	400,0	353,0	351,0	344,0
220	360,9	380,4	418,0	368,0	367,7	360,0
230	374,0	397,0	436,0	383,0	381,0	373,0
240	392,0	414,0	454,0	398,0	398,0	388,0
250	405,0	430,0	473,0	411,0	414,0	400,0
260	423,0	446,0	493,0	426,0	431,0	415,0
270	436,0	460,0	511,0	439,0	443,0	430,0
280	463,0	477,0	527,0	450,0	458,0	447,0
290	477,0	500,0	550,0	471,0	481,0	467,0
300	479,0	506,0	558,0	471,0	486,0	470,0
310	496,0	519,0	575,0	481,0	498,0	485,0
320	508,0	537,0	614,0	497,0	511,0	494,0
330	535,0	560,0	627,0	525,0	535,0	581,0
340	546,0	575,0	637,0	542,0	547,0	531,0
350	562,0	590,0	653,0	559,0	559,0	542,0
360	573,0	590,0	669,0	578,0	569,0	556,0



Das Thiazolidin aus L-Glycerinaldehyd und D-Penicillamin hat keinen Einfluß auf die anaerobe Glykolyse vom Ascitestumorzellen [Manometrie]

■ Kontrolle, ● 27 mM Thiazolidin, • 54 mM Thiazolidin

Abb. 8

7. Wirkung des Thiazolidin II auf die Atmung von Ascitestumorzellen

In einer letzten Versuchsreihe wurde die Wirkung des Thiazolidin II (aus L-Glycerinaldehyd und D-Penicillamin) auf die Atmung von Ascitestumorzellen untersucht. Diese Messungen erfolgten mit einer Eingefäßmethode nach O.Warburg (39, 40) mit Spezialgefäßen, die sehr große Anhänger zur Aufnahme von Carbonat/Bicarbonatpuffer zur Absorbtion der bei der Atmung und Glykolyse freiwerdenden Kohlensäure besitzen (Abb.9). Die Zusammensetzung des Carbonat/Bicarbonatpuffers wurde so gewählt, daß er mit einem CO_2-Partialdruck von 40 mm Hg im Gleichgewicht steht. Dadurch ist eine Messung des bei der Atmung verbrauchten Sauerstoffes bei physiologischem CO_2-Partialdruck möglich. In Tabelle 11 sind die Werte für den Sauerstoffverbrauch von Ascitestumorzellen in inaktiviertem Ascitesserum in Abwesenheit und in Gegenwart von 50 mM Thiazolidin II angegeben. Abbildung 10 zeigt, daß die Atmung auch bei einer Versuchsdauer von 5 Stunden nicht gehemmt wird.

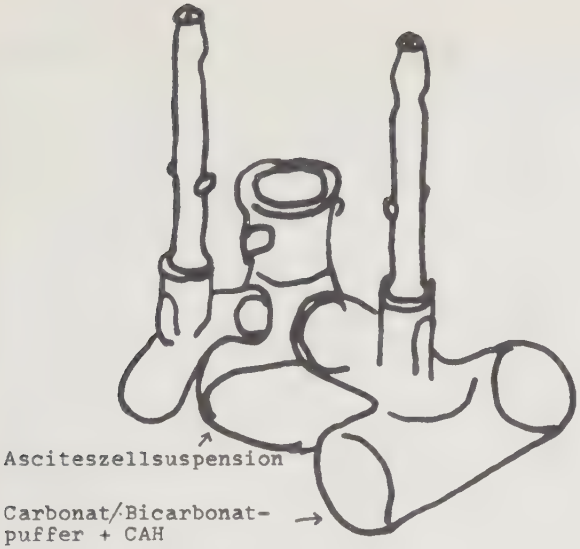


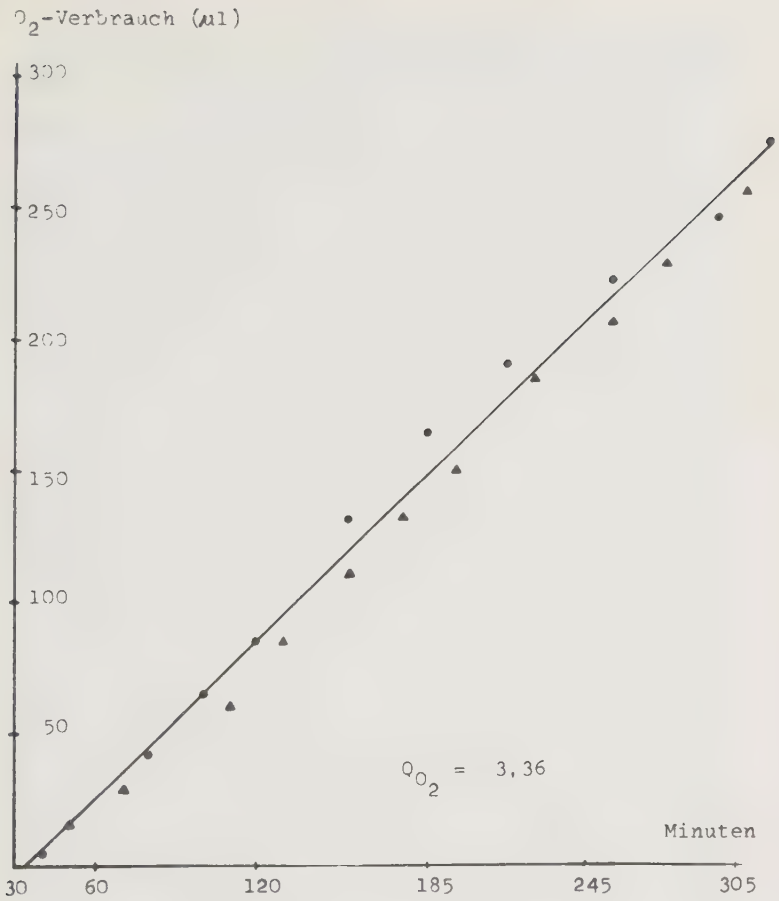
Abb. 9

Manometriegefäß nach O.Warburg zur Messung der Atmung mit einer Eingefäßmethode

Tab. 11

O_2-Verbrauch während einer Atmungsmessung von 5 Stunden

Inhibitor	-	50 mM Thiazolidin II	50 mM Thiazolidin II
Minuten		O_2-Verbrauch (µl)	
40	3,16	3,30	18,00
50	15,80	13,20	18,00
60	18,96	23,10	32,40
70	28,44	29,70	64,80
80	37,92	42,90	72,00
90	47,40	52,80	93,60
100	56,88	66,00	97,20
110	60,04	75,90	115,20
120	75,84	85,80	118,80
130	85,32	102,30	140,40
140	94,80	115,50	147,60
155	110,60	132,00	154,80
165	120,08	145,20	183,60
175	132,72	158,40	183,60
185	139,04	165,90	190,80
195	151,68	178,20	205,20
205	158,00	184,80	205,20
215	164,32	191,40	208,80
225	176,96	201,30	226,80
235	189,60	204,60	244,80
245	202,24	221,10	248,40
255	208,26	224,40	248,40
265	221,20	237,60	262,80
275	230,68	250,80	273,60
285	233,84	240,90	270,00
295	246,48	247,50	273,60



● 50 mM Thiazolidin II
(Verbindung aus L-Glycerinaldehyd und D-Penicillamin

▲ Kontrolle

Abb. 1o

Atmungsmessung (Eingefäßmethode):
Hauptraum: 3 ml inaktiviertes Ascitesserum, 102 µl Ascitestumorzellen, 50 µl 10 %ige Glucoselösung, 12,6 mg 0,05 M $NaHCO_3$; Anhänger: 3 ml 3 M $KHCO_3/K_2CO_3$-Puffer und 2 mg Carboanhydrase; Gasraum: 95 % Luft/5 % CO_2 (vor Versuchsbeginn Ansätze 15 Min. durchströmt). Temperatur 37°C, Frequenz 100/Min., Amplitude 2 cm.

Der Befund, daß in Gegenwart der Thiazolidine I und II eine erhebliche Hemmung auf die aerobe Glykolyse beobachtet wird (66 % bei 5-stündiger Vorinkubation in Gegenwart von 50 mM Thiazolidin II), während die anaerobe Glykolyse bei 50 mM Thiazolidin II selbst nach 6-stündiger Einwirkung nicht gehemmt wird, bedarf eingehender Betrachtung, da es sich ja um die gleichen Stoffwechselwege und Enzyme handelt, die so unterschiedlich beeinflußt werden.

Bei L-Glycerinaldehyd in freier Form ist die Größe der Glykolysehemmung nach den Befunden O.Warburgs (35) unter anaeroben Bedingungen bei einer Konzentration von 10 mM fast vollständig, während unter aeroben Bedingungen bei gleicher Aldehydkonzentration nur etwa eine 50 %ige Hemmung eintritt.

Unsere Befunde stehen damit in Einklang, wenn man annimmt, daß die Thiazolidine I und II ungespalten keinen Einfluß auf die Glykolyse ausüben und daß sie unter anaeroben Bedingungen im Stoffwechsel nicht unter Freisetzung wesentlicher Mengen von L-Glycerinaldehyd umgesetzt werden. Vermutlich werden aber unter aeroben Bedingungen, die sich mit den Thiazolidinen im Gleichgewicht befindlichen Aminothiole oxydiert oder anderweitig verstoffwechselt, wobei eine gewisse Anhäufung von L-Glycerinaldehyd und somit eine Hemmung der Glykolyse unter aeroben Bedingungen eintritt.

Daß kein Einfluß auf die Atmung von Ascitestumorzellen festgestellt werden konnte bestärkt diese Annahme, da auch freier L-Glycerinaldehyd nach O.Warburg (35) unter entsprechenden Bedingungen die Atmung von Ascitestumorzellen nicht beeinflußt. Die gefundene spezifische Wirkung der Thiazolidine I und II auf die aerobe Glykolyse tritt indessen erst bei so hohen Konzentrationen (50 mM) in erheblichem Ausmaß ein, daß wir auf Tierversuche verzichtet haben.

III. Beschreibung der Versuche

1. Apparate

Für die Messung des Gasstoffwechsels benutzten wir einen nach speziellen Angaben in der Werkstatt gefertigten Warburg-Apparat, bei welchem Amplitude und Schüttelfrequenz sehr genau reguliert werden konnten. Die photometrischen Messungen wurden mit dem Spektralphotometer PMQ II (Zeiss) und dem Photometer Eppendorf ausgeführt. Im lichtelektrischen Polarimeter $0{,}005^{\circ}$ (Zeiss) wurde die optische Drehung gemessen. Zur Messung des pH-Wertes benutzten wir die Beckman Glaselektrode Nr. 39290 und die gesättigte Kalomelelektrode Nr. 39270. Bei den Titrationen wurden die Reagenzlösungen mit einem Mikrodosimeter (Mikrobürette mit Quecksilberfüllung - ein µl entsprach einem Scalenteil - Fa. Dr.Ingold) zugegeben.

2. Chemikalien allgemein

D-Penicillamin-Hydrochlorid war ein Präparat der Firma Heyl und Co.; L-Cystein (analysenrein), L-Sorbose (analysenrein) und Bleitetraacetat bezogen wir von Merck, Darmstadt. Acetyl-Pyridin-Adenin-Dinucleotid (APAD) erhielten wir von Mann, Research Laboratories, New York. Lactatdehydrogenase (LDH) und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) von Boehringer, Mannheim. Stark basischen Anionenaustauscher - Permutit ESB 26 -

erhielten wir von der Permutit A.-G., Berlin; L-Glycerinaldehyd stellten wir uns nach A.S.Perlin und C.Brice (27) her.

3. Herstellung des Glycerinaldehydes und Kontrollen

a) Prinzip

L-Sorbose wird in Eisessiglösung mit Bleitetraacetat oxydiert, dabei werden die Bindungen zwischen den C-Atomen 2,3 und 4 oxydativ gespalten und es entsteht der Diester des L-Glycerinaldehydes mit Ameisensäure und Glycolsäure, der unter schonenden Bedingungen verseift wird. Die Säuren werden anschließend an einen Anionenaustauscher gebunden.

b) Durchführung

1,82 g (10 mMol) Sorbose wurden in 3 ml destilliertem Wasser gelöst und in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit 192 ml Eisessig versetzt. Unter heftigem Rühren wurden allmählich 10,83 g (25 mMol) Bleitetraacetat eingetragen. Der Gehalt des Bleitetraacetats war zuvor jodometrisch bestimmt worden; der Mindergehalt wurde in der Einwaage entsprechend berücksichtigt. Nach vollständiger Lösung wurde noch 20 Minuten gerührt. Dann wurden 27 g (30 mMol) Oxalsäure, die zuvor in circa 300 ml Eisessig gelöst worden waren, langsam unter weiterem Rühren hinzugegeben. Hierbei

entstand ein weißer Niederschlag von Bleioxalat. Nach Absetzen des Niederschlages wurde dieser auf einer Nutsche abgesaugt. Die Filtration mußte in der Regel wiederholt werden, um ein völlig klares Filtrat zu erhalten. Das Filtrat wurde dann im Rotationsverdampfer im Vakuum bei einer Badtemperatur von maximal 40° C bis zur Sirupkonsistenz eingedickt. Dieser Sirup, der hauptsächlich aus dem Diester des L-Glycerinaldehyds mit Ameisensäure und Glycolsäure bestand, wurde in einigen ml Essigsäureäthylester aufgenommen, wobei sich noch unlösliche Bleisalze (Oxalate) abschieden. Nach Filtration wurde die Lösung erneut im Vakuum eingedampft und der Ester in 30 ml 0,05 N Schwefelsäure aufgenommen und zur Hydrolyse der Esterbindungen 8 Stunden auf 50°C erwärmt. Die Lösung wurde durch Filtration über ein gehärtetes Filter geklärt. In das Filtrat wurde ein stark basischer Anionenaustauscher (Permutit ESB 26), der zuvor mit Bicarbonationen beladen worden war, eingeführt. Zur schnelleren Entfernung der entstandenen Kohlensäure wurde das Reaktionsgemisch in einen Exsiccator gestellt, und dieser für kurze Zeit evakuiert. Danach wurde der pH-Wert kontrolliert und, falls er kleiner als 5 war, neuer Anionenaustauscher hinzugesetzt und wie vorstehend verfahren. Der Gehalt dieser so entstandenen Glycerinaldehydlösung wurde jodometrisch und mit dem lichtelektrischen Polarimeter

bestimmt. Auf Abwesenheit anderer reduzierender Substanzen wurde papierchromatographisch geprüft. Die Ausbeute betrug im allgemeinen 60-70 % der Theorie.

Bestimmung des erhaltenen L-Glycerinaldehyds

a) Jodometrische Gehaltsbestimmung nach Willstätter-Schudel

0,5 ml der L-Glycerinaldehydlösung wurden mit 10 ml 0,1 N Jodlösung versetzt, dann mit 15 ml 0,1 N Natronlauge vermischt und die Mischung 5 Minuten im verschlossenen Schliffkolben gelassen. Dann wurde mit 2 ml etwa 1 N Salzsäure angesäuert und nach Zusatz von Stärkelösung mit 0,1 N Natriumthiosulfat auf farblos titriert.

b) Kontrolle der Drehung im lichtelektrischen Polarimeter

Das benutzte lichtelektrische Polarimeter besaß als Lichtquelle eine Quecksilberdampflampe, deren Licht keine Spektrallinie der Wellenlänge λ = 589 nm (D-Linie des Natrium-Lichtes) besitzt. Da die Literaturangaben (27) über die durch L-Glycerinaldehyd hervorgerufene Drehung der Ebene des polarisierten Lichtes sich aber stets auf Licht dieser Wellenlänge beziehen, mußte die entsprechende Drehung für die D-Linie des Natriumlichtes nach der Drude'schen Gleichung bzw.

graphisch ermittelt werden (Abb. 11). Zunächst wurde kontrolliert, ob die Drude'sche Gleichung für Glycerinaldehyd bei den benutzten Wellenlängen anwendbar war. Hierzu wurde für eine Glycerinaldehydlösung die Drehung der Ebene des polarisierten Lichtes mit den isolierten Spektrallinien der Quecksilberlampe bestimmt, wobei folgende Werte erhalten wurden.

Tab. 12

Rotationsdispersion von Glycerinaldehydlösung

Wellenlänge	α	$\frac{1}{\alpha}$	λ^2 x 10^{-4} (nm^2)
365	-1,155	0,866	13,3
405	-1,110	0,900	16,4
435	-1,015	0,986	18,9
546	-0,690	1,450	29,8
578	-0,615	1,626	33,4

Trägt man $\frac{1}{\alpha}$ gegen λ^2 auf, so erhält man eine Gerade, auf der sämtliche Meßpunkte, mit Ausnahme desjenigen für 365 nm liegen. Die Drude'sche Gleichung ist also anwendbar und man kann aus den Drehwerten für 546 nm (α_1) und 578 nm (α_2) den Umrechnungsfaktor für die Ermittlung des Drehwertes α_D bestimmen. Das erfolgte nach den folgenden Formeln: (s.S.48)

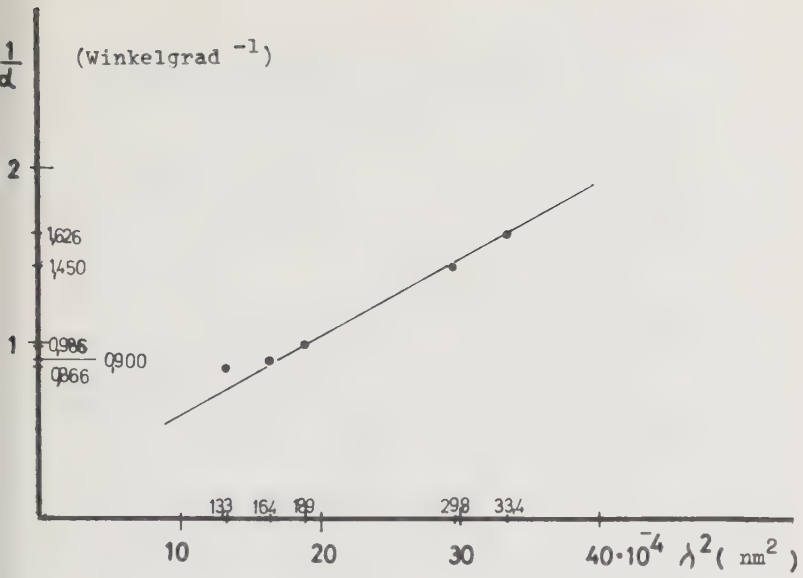


Abb. 11

Prüfung der Gültigkeit der Drude'schen Gleichung für wässrige Lösungen von Glycerinaldehyd

$$\frac{\alpha_2}{\alpha_1 - \alpha_2} \times 0{,}7285 = c \qquad \alpha_D = \frac{c}{c+1} \times \alpha_1$$

$\alpha_2 = -0{,}615$; $\alpha_1 = -0{,}690$; $\alpha_1 - \alpha_2 = -0{,}075$;

$$c = \frac{0{,}615}{0{,}075} \times 0{,}7285 = 5{,}9737; \qquad \frac{c}{c+1} = 0{,}8566^{*}$$

Mit diesem (*) Wert müssen die α-Werte, die bei 546 nm gemessen werden, multipliziert werden, um die α_D-Werte zu erhalten, die für die Berechnung der Konzentration für

Glycerinaldehyd notwendig sind.

$$\alpha_D = 0{,}8566 \times \alpha_{546}$$

Aus den α_D-Werten wurde die Konzentration der Glycerinaldehydlösung berechnet, wobei für die spezifische Drehung $(\alpha)_D^{20} = -8{,}4^\circ$ (27) eingesetzt wurde.

c) Chromatographische Reinheitsprüfung

Auf Chromatographiepapier (Schleicher und Schüll 43 b) wurden 20 µl der 1 : 10 verdünnten Lösung von Glycerinaldehyd und zum Vergleich 20 µl einer 0,25 %igen Sorboselösung aufgetragen. Als Laufmittel wurde ein Gemisch von 40 ml n-Butylalkohol, 10 ml Essigsäure und 50 ml Wasser benutzt. Nach dem Äquilibrieren während 30 Minuten wurde 5 1/2 Stunden aufsteigend chromatographiert.
Zur Detektion wurde Benzidinreagenz (0,5 g Benzidin, 20 ml Eisessig, 80 ml absoluter Alkohol) benutzt. Nach dem Besprühen wurde 5 Minuten auf 105° C im Trockenschrank erhitzt. Reduzierende Zucker und Aldehyde ergeben dabei braune Flecken. Es erwies sich, daß der Glycerinaldehyd das Ausgangsprodukt Sorbose nicht mehr enthielt. Nur eine schwache Verfärbung des Startpunktes und eine geringe Schwanzbildung der Flecken deuteten auf geringe Verunreinigungen hin. (R_F-Wert für Glycerinaldehyd 0,8).
Die Prüfung auf Reinheit in einem anderen System (80 % Chloroform, 20 % Äthylalkohol) brachte nach 3 1/2 Stunden Laufzeit das gleiche Ergebnis.

4. Messung der Reaktionsgeschwindigkeit im lichtelektrischen Polarimeter

a) Prinzip

Die beiden Ausgangsprodukte sind optisch aktiv, die 0,01 M Lösungen zeigen jedoch nur eine geringfügige Drehung der Ebene des polarisierten Lichtes, auch bei der Wellenlänge von 365 nm. Bei der Reaktion kommt es zur Bildung eines dritten asymetrischen Kohlenstoffatomes, und der Drehwinkel ändert sich beträchtlich, der Ablauf der Reaktion kann daher im Polarimeter verfolgt werden.

Die Messung wurde im lichtelektrischen Polarimeter[+)] durchgeführt. Es wurde ein temperierbares Polarimeterrohr verwandt, welches zur Konstanthaltung der Temperatur mit einem Umlaufthermostaten in Verbindung stand.

b) Durchführung

Zur Messung der Reaktion wurden äquivalente Mengen der Lösungen von L-Glycerinaldehyd und D-Penicillaminhydrochlorid (und zur Neutralisation Natronlauge)

[+)] Die lichtelektrische Polarimetrie beruht auf der Drehung der Schwingungsebene des polarisierten Lichtes durch ein magnetisches Feld. Durch Veränderung der Feldstärke des Magnetfeldes kann man Drehungsänderungen kompensieren. Die Messung ist so objektiv und erreicht eine reproduzierbare Genauigkeit von $0{,}002^{o}$.

zusammengegeben, und mit 0,2 M Phosphatpuffer vom pH 7,3 auf 20 ml ergänzt. Sofort nach dem Zusammengeben wurde eine Stoppuhr in Gang gesetzt. Die Änderung der Drehung wurde zu Beginn der Reaktion in Abständen von etwa einer Minute, später in größeren Zeitabständen gemessen, bis sich der Drehwinkel kaum noch änderte.

5. Verfolgen der Reaktion durch acidimetrische Titration der entstehenden Wasserstoff-Ionen

a) Prinzip

Die Basizität des Stickstoffes im Thiazolidinring ist erheblich geringer als im Cystein bzw. Penicillamin. Bei der Kondensation im neutralen Gebiet wird daher das zuvor am Aminostickstoff stehende Proton abgegeben und kann mit Lauge titriert werden, deren Menge gegen die Zeit aufgetragen den Reaktionsablauf zeigt.

b) Durchführung

Die pH-Werte werden mit einer Glaselektrodenkette gemessen. Aus einem Mikrodosimeter wurde zur Konstanthaltung des pH-Wertes 0,5 N Natronlauge zugegeben. Es wurde ein doppelwandiges temperierbares Titrationsgefäß benutzt, dessen Mantel mit Hilfe eines Umlauf-

thermostaten mit Wasser von 25° C durchströmt wurde. Zur Durchmischung und Entfernung von CO_2 wurde durch die Reaktionsmischung gereinigter Stickstoff geleitet (Polyäthylenschlauch).

Eine Lösung von D-Penicillamin-Hydrochlorid wurde auf pH 6,5 titriert (dieser pH-Wert ist der günstigste Meßwert, da der Thiazolidinstickstoff dabei noch keine Protonen anlagert und die Aminogruppe des Penicillamins nahezu vollständig protoniert ist). Dann wurde die Reaktion durch Zugabe einer äquivalenten Menge L-Glycerinaldehyd gestartet. Dabei wurde die Stoppuhr in Gang gesetzt und einige µl 0,5 N Natronlauge aus dem Dosimeter hinzugesetzt und jeweils die Zeit abgelesen, bei der der Zeiger des pH-Meters die Zahl 6,5 passierte. Nach erneuter Zugabe von Natronlauge wurde wie beschrieben verfahren, bis sich der pH-Wert nicht mehr änderte.

6. Präparative Herstellung der Thiazolidine aus L-Glycerinaldehyd und L-Cystein bzw. D-Penicillamin

In Analogie zu der von M.P.Schubert (28) bzw. G.Weitzel, J.Engelmann und A.M.Fretzdorf (33) für die Kondensationsprodukte von Cystein mit Brenztraubensäure bzw. Monosacchariden angegebenen Vorschrift haben wir die Thiazolidine aus L-Glycerinaldehyd mit L-Cystein bzw. D-Penicillamin hergestellt.

2-(α,β-Dihydroxy-äthyl)-4-carboxy-thiazolidin (Kondensationsprodukt aus L-Glycerinaldehyd und L-Cystein)

130 ml L-Glycerinaldehydlösung, die 40,9 mMol enthielt, wurde mit der äquimolaren Menge L-Cystein-Hydrochlorid (7,19 g) versetzt und zur Abpufferung der Säure 16 ml Pyridin (200 mMol) hinzugesetzt. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht stehen gelassen. Die Beendigung der Reaktion wurde durch Messung der Drehwinkel im Polarimeter kontrolliert. Die Drehung war nach etwa 30 Stunden konstant. Zur Aufarbeitung wurde der Ansatz im Rotationsverdampfer (Wasserstrahlpumpe und Vakuum, Badtemperatur 40° C) eingeengt bis nichts mehr überging. Der dabei entstandene sirupöse Rückstand wurde mit wenig absolutem Alkohol unter mäßigem Erwärmen verrieben (Pyridin-Hydrochlorid ist in Alkohol leicht löslich). Die Kristallbildung setzte bald ein, bei tagelangem Stehen vermehrten sich die Kristalle. Die Kristalle wurden abgesaugt und aus siedendem Methanol umkristallisiert. Nach erneutem Absaugen wurde die Substanz im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet.

2-(α , β -Dihydroxy-äthyl)-4-carboxy-5,5-dimethyl thiazolidin (Kondensationsprodukt aus L-Glycerinaldehyd und D-Penicillamin

150 ml L-Glycerinaldehydlösung (47,2 mMol) wurden mit der äquimolaren Menge D-Penicillamin-Hydrochlorid (8,77 g) versetzt und 19 ml (240 mMol) Pyridin zugegeben. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie beim vorangehenden Präparat.

Bei beiden Präparaten kann die bei der Verseifung des L-Glycerinaldehyd-Diesters erhaltene Lösung ohne vorherige Entfernung der Säuren durch Anionenaustauscher zur Umsetzung mit L-Cystein bzw. D-Penicillamin verwendet werden, wenn entsprechende Mengen Pyridin zur Neutralisation zugesetzt werden. Diese Vereinfachung ist insofern wesentlich, da bei Entfernung der Säure durch den Austauscher auch größere Mengen L-Glycerinaldehyd verloren gehen.

7. Charakterisierung der Thiazolidine

Zur Charakterisierung der Thiazolidine und Prüfung auf Reinheit wurden Schmelzpunktbestimmungen und Elementaranalysen durchgeführt. Eine Ermittlung der pK-Werte aus den pH-Titrationskurven gibt über die Einbeziehung der N-Atome in die Thiazolidinringe Auskunft.

2-(α,β-Dihydroxy-äthyl)-4-carboxy-thiazolidin

Schmelzpunkt: 149° C

Bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergeben 28,91 mg einen Verbrauch von 7,30 (7,32) ml 0,02 N Salzsäure entsprechend einem Gehalt von 7,07 (7,08) % Stickstoff.

Berechnung für $C_6H_{11}O_4NS$: 7,25 % Stickstoff

2-(α,β-Dihydroxy-äthyl)-4-carboxy-5,5-dimethyl-thiazolidin

Schmelzpunkt: 168-170° C

Bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verbrauchen 33,15 (33,13) mg 7,21 (7,18) ml 0,02 N Salzsäure entsprechend einem Gehalt von 6,09 (6,07) % Stickstoff.

Berechnet für $C_8H_{15}O_4NS$: 6,21 % Stickstoff

Bei der CH-Bestimmung +) wurden 42,92 bzw. 42,71 % Kohlenstoff gefunden (Theorie: 43,43 %) und 6,81 % Wasserstoff bzw. 6,81 % Wasserstoff (Theorie: 6,83 %)

Das Thiazolidin aus L-Glycerinaldehyd und D-Penicillamin ließ sich mit dem Aldehyd-Reagenz Dimedon nicht spalten (70 mg = 0,32 mMol Glycerinaldehyd-Penicillaminverbindung), wurde in 3,3 ml 0,1 N Natronlauge aufgelöst und mit 3 ml Phosphatpuffer (pH 7,3) versetzt. Eine Dimedonlösung (140 mg = 1 mMol) in 1 ml Äthanol wurde zugesetzt.

+) Die CH-Bestimmung wurde im analytischen Laboratorium der Schering A.-G. durchgeführt.

Bestimmung der pK-Werte

Zur Bestimmung der pK-Werte wurden die pH-Titrationskurven der Thiazolidine in 0,1 N KCl-Lösung durch Titration mit 0,1 N KOH unter laufender Bestimmung der pH-Werte mit der Glaselektrodenkette aufgenommen. Die Temperatur wurde mit einem Umlaufthermostaten auf 25° C konstant gehalten.

Bestimmung des Thiazolidinschwefels mit p-Chlormercuribenzoat

a) Prinzip

Wir fanden (13), daß zur Bestimmung des Schwefels in einfachen Thiazolidinverbindungen die Reaktion mit p-Chlormercuribenzoat (Überschuß) geeignet ist. Nach 90 Minuten wird das nicht umgesetzte p-CMB mit Cysteinlösung zurücktitriert.

b) Durchführung

Die Messung erfolgte in Quarzküvetten von 4 cm Schichtdicke im Spektralphotometer mit einer Meßstrahlung der Wellenlänge 250 nm.

18,66 mg p-Chlormercuribenzoat-Na (0,05 mMol) wurden mit 5 ml 0,01 N Natronlauge versetzt und mit Wasser auf 50,0 ml aufgefüllt. (1 mM Stammlösung). 5 ml dieser Stammlösung wurden vor dem Versuch im 200 ml Meßkolben mit 33 ml 1 N NaOH und 66 ml N Essigsäure versetzt und mit Wasser aufgefüllt. Der pH-Wert betrug dann 4,6.

Der genaue Titer dieser etwa 25 µM p-Chlormercuribenzoatlösung wurde durch Titration mit 0,502 mM Cysteinlösung bestimmt (4,409 mg Cysteinhydrochlorid wurden hierzu in 50 ml Wasser gelöst, welches zuvor mit gereinigtem Stickstoff durchgast wurde, um den gelösten Sauerstoff zu entfernen). Die Zugabe der Cysteinlösung erfolgte mit einer 50-µl-Konstriktionspipette. Nach jeder Zugabe wurde gemischt und die Extinktion abgelesen. Der Äquivalenzpunkt wurde graphisch aus dem Diagramm Extinktion/Volumen der Cysteinlösung zu 495 µl ermittelt. (vgl. Abb. 7)

Beim nächsten Versuch wurde die gleiche p-Chlormercuribenzoatmenge zugesetzt und mit 194 µl einer Lösung versetzt, die durch Auflösen einer genau gewogenen Menge Thiazolidin I bzw. II in 50 ml mit gereinigtem Stickstoff durchgasten Wasser bereitet worden war. In den 194 µl waren 18,35 µg Thiazolidin I bzw. 22,45 µg Thiazolidin II enthalten.

Die Extinktion nahm zuerst schnell, später langsamer zu und war nach 30 Minuten konstant. Nach 90 Minuten erfolgte die Rücktitration des p-Chlormercuribenzoats wie oben beschrieben mit 0,502 mM Cysteinlösung.

Der Äquivalenzpunkt wurde wie vorstehend ermittelt; die Differenz des Verbrauchs zum Leerwert entsprach der durch die Thiazolidine verbrauchten p-CMB-Menge.

8. Isolierung von Ascitestumorzellen

Ehrlich-Ascitestumorzellen, die wir vom Max-Planck-Institut füt Zellphysiologie, Berlin-Dahlem, erhalten und in unserem Institut auf Albinomäusen (IMNR) weitertransplantiert hatten, wurden zum Versuch einer größeren Zahl von in Koloniezucht gehaltenen Albinomäusen (IMNR) inokuliert.
8 Tage nach der Inokulation wurden die Mäuse dekapitiert, das Abdomen eröffnet und der Ascites mit einer Pipette entnommen. Bei 3000 U./ Min. wurde dann 10 Minuten zentrifugiert.

9. Inaktivierung von Ascitesserum (34)

Zur Herstellung inaktivierten Serums, wurde der Überstand abgegossen, 10 Minuten auf 57° C im Thermostaten erhitzt und schließlich klar zentrifugiert.

10. Bestimmung und Einstellung der Alkalireserve (Standard-Bicarbonat) in inaktiviertem Mäuseascitesserum

0,2 ml Serum, die mit 1,5 ml 0,9%iger Natriumchloridlösung verdünnt worden waren, wurden in Warburggefäßen 15 Minuten mit einem 5%igen CO_2/N_2-Gemisch begast und anschliessend 0,3 ml 1 N Schwefelsäure eingekippt. Aus der Druckzunahme wurde der Bicarbonat-Gehalt des Serums berechnet und zu der gesamten Menge des inaktivierten Serums soviel Bicarbonat gegeben, daß der Gehalt 33 mMol/l, (das entspricht einer Alkalireserve von 74 Volumenprozent) betrug. Dieser hohe Bicarbonatgehalt war wegen der langen Dauer der manometrischen Messungen und der entsprechend großen Milchsäurebildung notwendig. Dem inaktivierten Serum wurden weiter 3 mg Penicil-

lin-G und 5 mg Streptomycin-Sulfat hinzugesetzt.

11. Herstellung der Zellsuspensionen

a) für die anaerobe Glykolyse

Abzentrifugierte Asciteszellen wurden mit inaktiviertem Ascitesserum einmal gewaschen und zur Messung in soviel inaktiviertem Ascitesserum suspendiert, daß die Zellkonzentration 3 - 4 % betrug.

b) für die Atmung

Die Suspension wurde wie bei a) hergestellt.

c) für die aerobe Glykolyse

Die gewonnenen Zellen wurden 2 mal mit Natriumchlorid-Phosphatpuffer gewaschen. (0,01 M Phosphat, 0,9 % Natriumchlorid, pH 7,4).

Die Asciteszellen wurden in dem gleichen Natriumchlorid-Phosphatpuffer, dem jedoch pro ml 1 µMol $NaHCO_3$ zugesetzt wurde, suspendiert. Die Zellen wurden in soviel Flüssigkeit suspendiert, daß der Cytokrit-Wert etwa 3 - 4 % betrug.

12. Bestimmung der Cytokrit-Werte

Der genaue Gehalt wurde mit Cytokrit-Röhrchen nach Kaffka in 1 ml der Suspension bestimmt. Hierzu wurde 1 ml der Suspension in dem mit einer graduierten Kapillare versehenen Röhrchen 5 Minuten bei 3000 U./Min. zentrifugiert und das Volumen der sedimentierten Zellen abgelesen.

13. Messung der aeroben Glykolyse

a) Inkubation

Prinzip:

Die Zellsuspension wurde mit Luft, die 5 % CO_2 enthielt, 1 Stunde in Gegenwart von Glucose geschüttelt. Zu Beginn und Ende dieser Versuchsperiode wurde in enteiweißten Proben die Milchsäure nach H.Holzer u.a. (12) bzw. H.J.Hohorst (11) bestimmt.

Durchführung:

Zu 10 ml der Zellsuspension, die wie im einzelnen angegeben vorbehandelt worden waren (siehe Tab. 5, 6, 7) wurden 0,5 ml 0,4 %ige Glucoselösung gegeben und bei 37° C mit einer Frequenz von 100/Min. während 1 Std. im Warburg-Thermostaten geschüttelt. Die Suspension befand sich hierbei im kleinen Erlenmeyerkolben, die Gasatmosphäre war 5 % CO_2/Luft. Unmittelbar nach dem Glucosezusatz und nach der 1-stündigen Inkubation wurden je 1 ml des Ansatzes entnommen und im Zentrifugenglas mit 1 ml 6 %iger Perchlorsäure versetzt.
Von dem klaren Überstand der enteiweißten Proben wurden zwischen 50 und 100 µl (Konstriktionspipette) zur Milchsäurebestimmung mit dem optischen Test entnommen. (Eine vorherige Neutralisation der Proben war nicht erforderlich).

b) Milchsäurebestimmung mit NAD in Gegenwart von Hydrazin (11)

Prinzip:

Das Gleichgewicht der Reaktion

$$\text{L-Lactat} + \text{NAD} \rightleftarrows \text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

und dessen Einstellung liegt weit auf der Seite von Lactat und NAD. Es kann jedoch vollständig auf die Seite von Pyruvat und NADH verschoben werden, wenn in alkalischem Milieu mit großem Überschuß von NAD gearbeitet und mit Hydrazin das während der Reaktion gebildete Pyruvat abgefangen wird. Als Meßgröße dient die durch NADH verursachte Lichtabsorption bei 366 nm.

Durchführung:

Leerwert: 2 ml 0,5 M Glycin-Pufferlösung, die auch 0,4 M Hydrazin enthielt (pH 9), 118,4 µl 3 %ige Perchlorsäure und 35,6 µl Lactat-Dehydrogenasesuspension (2 mg/ml)

Reaktionsansatz: Die gleichen Lösungen wie im Leerwert, jedoch wurde der Perchlorsäurelösung 118,4 µl vom klaren Überstand des Inkubationsansatzes (siehe 13 a) zugegeben (Gesamtvolumen 2,354 ml).

Die Reaktion wurde gestartet, indem in genau eingehaltenen Zeitabständen von 5 Minuten in jeden Ansatz 0,2 ml einer 0,027 M NAD-Lösung einpipettiert wurden. Nach Mischen der Ansätze wurden sie 60 Minuten bei 25°C inkubiert und darauf die Extinktionen von Leerwert und

Reaktionsansätzen in Zeitabständen wie oben gegen eine mit destilliertem Wasser gefüllte Küvette gemessen. Die Extinktionen des Leerwertes wurden von den Extinktionen der Reaktionsansätze abgezogen und aus der Extinktionsdifferenz, dem Gesamtvolumen und dem Extinktionskoeffizienten ($3{,}3 \times 10^6 \frac{cm^2}{Mol}$) die in der Küvette enthaltenen μMol Milchsäure berechnet.

c) Milchsäurebestimmung mit Acetyl-Pyridin-Adenin-Dinucleotid (APAD) nach H.Holzer u.a. (12)

Prinzip:

Wenn im NAD-Molekül statt der Amid-Gruppe der Rest $-CO-CH_3$ steht (APAD), ist das Redoxpotential erheblich positiver und die Milchsäure wird daher in Gegenwart von Lactat-Dehydrogenase durch APAD unter geeigneten Bedingungen zu Brenztraubensäure oxydiert, wobei die äquivalente Menge der reduzierten Form (APADH) entsteht. Die Konzentration von APADH kann unmittelbar durch Messen der Extinktion bei 366 nm ermittelt werden. Der molare Extinktionskoeffizient von APADH beträgt bei dieser Wellenlänge $\varepsilon = 9{,}1 \times 10^6 \frac{cm^2}{Mol}$.

Besondere Fängersubstanzen für Brenztraubensäure werden bei dieser Methode nicht benötigt. Deshalb ist sie genauer und weniger störanfällig als die zuvor unter 13 b) beschriebene.

Durchführung:

Das Photometer Eppendorf war für diesen Zweck mit einem

Schreiber ausgestattet.

2,5 ml 1 M Glycin-Natronlauge-Puffer vom pH 9,5 (der mit frisch hergestellter 1 N Natronlauge bereitet worden war), wurde in 1 cm OS Glas-Küvetten gegeben, 150 µl APAD-Lösung (10 mg/ml) und 50 µl (Könstriktions-pipette) des Überstandes (s.o.) wurden dazu pipettiert. In der Leerwert-Küvette wurde die Probe durch das entsprechende Volumen Perchlorsäurelösung ersetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Lactat-Dehydrogenase-Suspension (2 mg/ml) gestartet. Nach etwa 30 Minuten war die Reaktion beendet. Die Extinktionsdifferenz wurde, wie aus Abb.12 ersichtlich, ermittelt. Die Extinktionsdifferenz ergab bei Multiplikation mit dem in der Küvette befindlichen Volumen und Division durch 9,1 (Extinktionskoeffizient x 10^{-6}) die µMol Milchsäure in der Küvette.

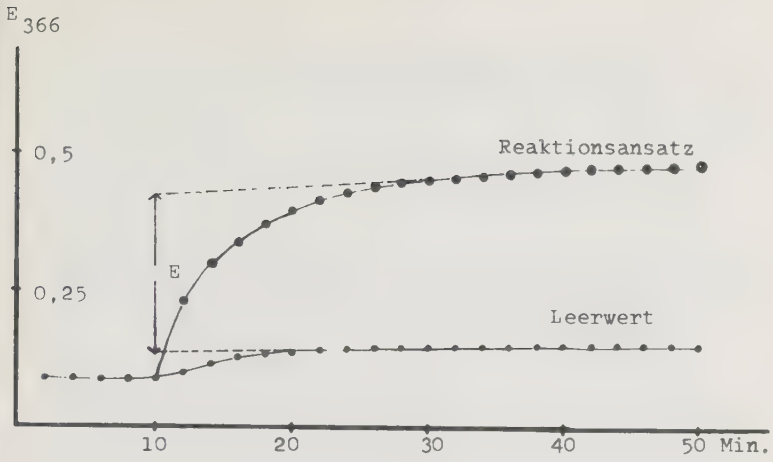


Abb. 12

Ermittlung von ΔE bei der Milchsäurebestimmung mit Acetyl-Pyridin-Adenin-Dinucleotid (APAD) und Lactat-Dehydrogenase nach Holzer u.a. (12).

14. Messung der anaeroben Glykolyse

a) Prinzip

Nach einer Versuchsordnung von O.Warburg (38) kombinierten wir die Messung der anaeroben Glykolyse und die Bestimmung der für die Berechnung der gebildeten Milchsäure aus den Manometerständen erforderlichen Milchsäurekonstanten in einem Versuchsgang.

Dazu wurde nach Beendigung der Glykolysemessung eine bekannte Menge Milchsäure aus dem Anhänger in den Hauptraum gekippt und aus der hierbei eintretenden Druckerhöhung die Konstante berechnet.

b) Durchführung

Wir benutzten Warburg-Gefäße mit einem Anhänger.

3 ml der Zellsuspension (Vorbehandlung siehe Tab. 8,9) und 0,5 ml einer 10%igen Glucoselösung wurden in den Hauptraum der Gefäße gegeben. Das Anhängergefäß enthielt 100 µl einer 0,05 N Milchsäurelösung. Die Gefäße wurden zunächst bei einer Frequenz von 100/Min. während 15 Minuten mit einer Gasmischung von 5%CO_2/95% N_2 bei 37° C geschüttelt, sodann verschlossen und die Manometerstände alle 10 Minuten notiert.

Nach etwa 3 Stunden wurde die Milchsäure aus den Anhängern in die Haupträume gekippt und die Manometerstände weitere 60 Minuten gemessen.

Aus der Menge der in die Haupträume der Gefäße gekippten Milchsäure (a) in µl (1 µMol Milchsäure= 22,41 µl) und

dem hierbei entstandenen Kohlensäuredruck (h) in mm Brodie, die während der ersten 10 Minuten nach dem Einkippen der Milchsäure gemessen wurden, läßt sich die Milchsäurekonstante berechnen ($K_m = \frac{a}{h}$).

15. Messung der Atmung mit einer Eingefäßmethode bei physiologischem CO_2-Partialdruck nach O.Warburg (40)

a) Prinzip

Bei dieser Methode wird der durch die Zellen verbrauchte Sauerstoff unter physiologischem CO_2-Partialdruck gemessen. Die bei der Atmung und Glykolyse freiwerdende Kohlensäure wird hier nicht durch Lauge, sondern durch ein relativ großes Volumen Carbonat-Bicarbonat-Puffer absorbiert. Das Verhältnis von Bicarbonat zu Carbonat (80/20 bei 3 M Lösungen) wird so gewählt, daß der Gleichgewichtsdruck von CO_2 einem Gehalt von 5 Volumenprozent in der Gasphase entspricht. Zur Beschleunigung der CO_2-Absorption wurden dem Puffer einige mg Carboanhydrase zugesetzt. Der Puffer befand sich in den großen Anhängern spezieller Manometrie-Gefäße.

b) Durchführung

Zur Messung der Atmung wurden in den Hauptraum der Gefäße 3 ml der Zellsuspension pipettiert und 0,06 ml einer 10 %igen Glucoselösung hinzugefügt. In den Anhänger kamen 3 ml 3 M $KHCO_3/K_2CO_3$-Puffer und 2 mg Carboanhydrase. Die Gefäße wurden mit den Manometern verbun-

den und im Warburg-Thermostaten bei 37°C 15 Minuten unter Schütteln mit 5 % CO_2/95 % Luft durchströmt. Nach Schließen der Hähne wurden unter Konstanthalten der Gasvolumina nach jeweils 10 Minuten die Druckänderungen in mm Brodie abgelesen. Durch Multiplikation der abgelesenen Druckänderungen mit der Gefäßkonstanten (K_{O_2}) erhielten wir den Sauerstoffverbrauch in µl.
Die Gefäßkonstanten wurden nach der Formel

$$K = \frac{V_G \times \frac{273}{T} + V_F \times \alpha_{O_2}}{P_O}$$

berechnet.

Hierbei bedeuten:

V_G = Volumen des Gasraumes (Totalvolumen - Flüssigkeitsvolumen)

V_F = Volumen der Flüssigkeit

α_{O_2} = Bunsenscher Absorptionskoeffizient = 0,0239 für H_2O

T = absolute Temperatur = 310°

P_O = Normaldruck in mm Brodie (760 Torr = 10 000 mm Brodie)

IV. Zusammenfassung

1. Aus L-Glycerinaldehyd wurden durch Kondensation mit L-Cystein bzw. D-Penicillamin Thiazolidine[+)] hergestellt.
2. Die Geschwindigkeit der Reaktionen wurde im lichtelektrischen Polarimeter verfolgt. Bei einer Meßstrahlung mit der Wellenlänge von 365 nm trat eine beträchtliche Änderung der Drehwinkel auf.
3. Die Geschwindigkeit der Reaktion von L-Glycerinaldehyd mit D-Penicillamin wurde auch durch Titration der dabei entstehenden Wasserstoff-Ionen verfolgt.
4. Aus den Messungen nach 2. bzw. 3. wurden die Geschwindigkeitskonstanten der bimolekularen Reaktionen zu 0,0025 l/mMol x Min. (Reaktion mit L-Cystein) und zu 0,0070 l/mMol x Min. (Reaktion mit D-Penicillamin) berechnet.
5. Zur Charakterisierung der Thiazolidine wurden Elementaranalysen durchgeführt, deren Ergebnisse der Theorie entsprachen.

[+)] 2-(α,β-Dihydroxy-äthyl)-4-carboxy-thiazolidin (Thiazolidin aus L-Glycerinaldehyd und L-Cystein) = Thiazolidin I

2-(α,β-Dihydroxy-äthyl)-4-carboxy-5,5-dimethyl-thiazolidin (Thiazolidin aus L-Glycerinaldehyd und D-Penicillamin) = Thiazolidin II

6. Die pH-Titrationskurven der Thiazolidine wurden aufgenommen und daraus die pK-Werte zu 5,15 für Thiazolidin I und 5,00 für Thiazolidin II (vgl. +) S. 68) bestimmt. Ihre Werte lassen auf eine Beteiligung der NH_2-Gruppe bei der Kondensation schließen.
7. Die hergestellten Thiazolidine reagieren quantitativ mit p-Chlormercuribenzoat unter Mercaptidbildung, was sich an der Extinktion bei einer Wellenlänge von 250 nm verfolgen läßt.
8. Die nach 1. erhaltenen Thiazolidine hemmen die aerobe Glykolyse von Ascitestumorzellen in vitro, die größte gefundene Hemmung betrug 66% und wurde bei einer Konzentration von 50 mM Thiazolidin II gefunden.
9. Die anaerobe Glykolyse von Ascitestumorzellen wurde durch die Thiazolidine auch bei 6-stündiger Einwirkungszeit von 50 mM Thiazolidin II nicht beeinflußt.
10. Auch die Atmung dieser Zellen wurde in Gegenwart von 50 mM Thiazolidin II während 5 Stunden nicht beeinflußt.

V. Literaturverzeichnis

1. Armstrong, M.D. und V.du Vigneaud
J. biol. Chemistry, 173, 749 (1948)
"Mercaptals and Mercaptoles of Cysteine"

2. von Ardenne, M. und R.Tümmler
Dtsch. Gesd. Wesen, Berlin, 19, 709 (1964)
"Zur Messung der Konzentration von DL-Glycerinaldehyd in Blut bzw. Infucoll-Blutgemischen und zur Bestimmung der Krebstherapie-Wirkdosis aus solchen Messungen"

3. von Ardenne, M.
Dtsch. Gesd. Wesen, Berlin, 19, 49 (1964)
"Ein Durchbruch der Chemotherapie des Krebses auf der Grundlage jüngster Arbeiten von O.Warburg"

4. Boyer, P.D.
J.Amer. chem. Soc., 76, 4331 (1954)
"Spectophotometric Study of the Reaction of Protein Sulfhydryl Groups with Organic Mercurials"

5. Brock, N. und T.Niekamp
Z. Krebsforschung 67, 93 (1965)
"Zur Frage der Cytostatischen Wirksamkeit von D-Glycerinaldehyd"

6. Drews, J., P.Wahl und E.Fölsch
Klin. Wschr. 42, 776, (1964)
"Die Wirkung von Glycerinaldehyd auf Glycineinbau, Atmung und Gärung von Ascitestumorzellen"

7. Eigen, M.
Diskussionsbemerkung in Mechanismen enzymatischer Reaktionen, S.41, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1964)

8. Eldjarn, L., K.F.Nakken und A.Pihl
Acta Chem. Scand. 11, 1085 (1957)
"The Interaction of Cysteamine and Cysteine with various Carbonyl-Compounds"

9. Embden, G., E.Schmitz und M.Wittenberg
Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem., 88, 210 (1913)
"Über synthetische Zuckerbildung in der künstlich durchströmten Niere"

10. Guidotti, G.G., A.Fonnesu und E.Ciaranfi
Cancer Res., 24, 900 (1964)
"Inhibition of Amino Acid Incorporation into Protein of Yoshida Ascites Hepatoma Cells by Glycerinaldehyde"

11. Hohorst, H.J.
Biochem. Z. 328, 509 (1957)
"Enzymatische Bestimmung von L(+)-Milchsäure"

12. Holzer, H. und H.D.Söling
Biochem. Z. 336, 201 (1962)
"Bestimmung von L-Lactat, L-Malat, L-Glutamat und Äthylalkohol im enzymatisch-optischen Test mit Hilfe des DPN-Analogen 3-Acetyl-Pyridin-DPN"

13. Körber, F., D.Modersohn und P.Siegmund
Z. klin. Chem. klin. Biochem. 6, 289 (1968)
"Über die photometrische Titration von Thiazolidinen mit p-Mercuribenzoat und die Anwendung zur enzymatisch photometrischen Penicillinbestimmung"

14. Kaplan, N.O. und M.M.Ciotti
J.biol.Chemistry, 221, 823, (1956)
"Chemistry and Properties of the 3-Acetyl-pyridine Analogue of Diphosphorpyridine Nucleotide"

15. Langen, P., H.Bielka und J.Stahl
Acta biol. med. german. 19, 17, (1967)
"Über die biochemischen Ursachen der Zytostatischen Wirkung von Glycerinaldehyd"

16. Lardy, H.A., V.D.Wiebelhaus und K.M.Mann
J.biol.Chemistry, 187, 325 (1950)
"The Mechanism by which Glycerinaldehyde inhibits Glycolysis"

17. Lettre, H.
Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 268, 59, (1941)
"Einige Beobachtungen über das Wachstum des Mäuse-Ascites-Tumors und seine Beeinflußung"

18. Lettré, H.
Z.Krebsforsch., 57, 1 (1951)
"Einige Versuche mit dem Mäuseascitestumor"

19. Lettré, H.
Naturwissenschaften 38, 490, (1951)
"Zellstoffwechsel und Zellteilung"

20. Lewerenz, H.-J.
Z.Krebsforsch. 69, 260 (1967)
"Zur Wirkung von DL-Glycerinaldehyd auf permanente Kulturen menschlicher Zellen"

21. de Maeyer, L.
"Chemische Kinetik"
in "Ullmann's Enzyclopädie der technischen Chemie"
Hrsg, W.Foerst, 3.Auflage, Bd. 2/1, S.686,
Urban u. Schwarzenberg, München, Berlin (1961)

23. Mendel, B.
Klin. Wschr. 8, 169 (1929)
"Krebszellen und Glycerinaldehyd"

24. Mendel, B., F.Strelitz und D. Mundell
Nature (London), 141, 288, (1938)
" D-Glycerin Aldehyde and Tumour Glycolysis"

25. Meyerhof, O., K.Lohmann und Ph. Schuster
Biochem. Z. 286, 319 (1936)
"Über die Aldolase, ein Kohlenstoff verknüpfendes Ferment"
Mitteilung II : Aldolkondensation von Dioxyacetonphosphorsäure mit Glycerinaldehyd"

26. Motycka, K. und L. Lacko
Z. Krebsforsch. 68, 195 (1966)
"Die Wirkung des D,L-Glycerinaldehyds und mit ihm chemisch verwandter Stoffe auf die experimentelle Mäuse-Hämoblastose L 14 AKR in vivo"

27. Oelkers, W., M. Wenzel und P. Schmialek
Z. Naturforsch. 20b, 227 (1965)
"Einbauhemmung ^{14}C-markierter Nucleoside in DNS und RNS von Ascitestumorzellen durch D- und L- Glycerinaldehyd"

28. Perlin,A.S. und C. Brice
Canad. J. Chem. 34, 85 (1956)
"Preparation of D- and L-Glycerinaldehyde from Ketohexoses"

29. Schubert, M.P.
J. biol. Chemistry 114, 341 (1936)
"Compounds of thiol acids with aldehydes"

29. Scholz, R., H.Schmitz, Th.Bücher und J.O.Lampen
Biochem. Z. 331, 71 (1959)
"Über die Wirkung von Nystatin auf Bäckerhefe"

30. Schramm, T.
Acta biol. med. germ. 15, 343 (1965)
"Modellversuche zu Fragen einer Tumortherapie durch Glycerinaldehyd"

31. Siegmund, P. und F.Körber
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 317 (1968)
"Erdalkalichelate von hydrolytisch spaltbaren Chelatbildnern, III.
Reaktionsgeschwindigkeiten und Gleichgewicht in wäßrigen Lösungen von N-Carboxymethyl-cystein, Brenztraubensäure und (2-Methyl-2,4-dicarboxy-thiazolidinyl-(3))-essigsäure"

32. Sykes und Todd, zit. nach A.H.Cook und J.M.Heilbron in: "The Chemistry of Penicillin" S.960
Hrsg. H.T.Clarke, J.R.Johnson und R.Robinson,
Princeton University Press, Princeton (1949)

33. Weitzel, G., J.Engelmann und A.M.Fretzdorff
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 315, 236 (1959)
"Darstellung und Bildungstendenz von Zucker-Cystein-Verbindungen und ihren Komplexsalzen. Stabilitätskonstanten der Zink- und Kobalt (II)-komplexe"

34. Warburg, O., K.Gawehn und G.Lange
Z. Naturforsch. 9b, 109 (1954)
"Über das Verhalten von Asciteskrebszellen zu Zymohexase"

35. Warburg, O., K. Gawehn, A.-W. Geissler und S. Lorenz
Z. klin. Chem. 1, 175 (1963)
"Über Heilung von Mäuse-Ascites-Krebs durch D- und L- Glycerinaldehyd"

36. Warburg, O., K. Gawehn und A.-W. Geissler
Z. Naturforsch. 13b, 61 (1958)
"Über die Entstehung des Krebsstoffwechsels in der Gewebekultur"

37. Warburg, O., K. Gawehn und A.-W. Geissler
Z. Naturforsch. 13b, 588 (1958)
"Katalasegehalt, Gärung und Atmung in der Zellkultur nach Dulbecco-Vogt"

38. Warburg,O., F. Kubowitz und W. Christian
Biochem. Z. 242, 170 (1931)
"Über die Wirkung von Phenylhydrazin und Phenylhydroxylamin auf den Stoffwechsel der roten Blutzellen"

39. Warburg, O., und G. Krippahl
Z. Naturforsch. 15b, 364 (1960)
"Weiterentwicklung der manometrischen Methoden (Carbonatgemische) "

40. Warburg, O. und K. Gawehn
"Über die Messung der Atmung von Krebszellen mit einer 1-Gefäßmethode"
in: O. Warburg, "Weiterentwicklung der zellphysiologischen Methoden" s. 618
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1962)

VI. Lebenslauf

Geboren wurde ich, Dagmar Modersohn, am 22.6.1942 in Danzig als Tochter des damaligen Majors der Luftwaffe Dr.Günther Modersohn und seiner Ehefrau Irmgard geb. Brandes. 1948 wurde ich in die Bürgerschule in Altenau (Oberharz) eingeschult. In Clausthal-Zellerfeld (Harz) besuchte ich dann zunächst die Volksschule, später die Robert-Koch-Schule, ein staatliches Gymnasium für Jungen und Mädchen. 1955 wurde ich in die Heinrich-Schütz-Schule in Kassel, ein Gymnasium für Mädchen, umgeschult. Dort legte ich 1962 mein Abitur ab. Im gleichen Jahre begann ich an der Freien Universität Berlin Medizin zu studieren. An dieser Universität absolvierte ich 1963 das Vorphysikum, 1965 das Physikum und schloß im Dezember 1968 mein Studium mit dem Staatsexamen ab.

Nach dem Staatsexamen war ich 4 Monate als Medizinal-Assistentin in der Chirurgischen Abteilung des St.Gertrauden-Krankenhauses in Berlin tätig.